

## 微生物の共生戦略の分子機構と多様性

著者	東北大学遺伝生態研究センター
雑誌名	IGEシリーズ
巻	26
ページ	1-190
発行年	1999-03
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/49111">http://hdl.handle.net/10097/49111</a>

IGEシリーズ26\*\*\*

# 微生物の共生戦略の 分子機構と多様性



**IGE**

東北大学遺伝生態研究センター  
Institute of Genetic Ecology

## IGEシリーズの発刊にあたって

地球上の環境は、今、かつてない大きな問題に直面しております。世界各地で進行している生態系の急速な変化のなかには、人間生活に深刻な影響をもたらす可能性のあるものが、多数含まれています。一方、人間の活動が宇宙空間へと拡がるにつれ、地球外生態系の構築が、新しい課題として登場しつつあります。生態系の崩壊を防ぎ、より豊かな環境を創造するための科学的努力が、今日ほど強く求められている時はありません。

本研究センターは、DNA 分子技術を中心に遺伝子的段階にまで到達した生物研究の諸成果を生かし、生態系における生物の生活を一層深く解明し、新たな人間環境の創造に貢献することを目指しております。いうまでもなく、この課題はきわめて学際的であり、多分野の研究者との相互交流と協力によって、はじめて達成されるものであります。本研究センターでは、ワークショップによる研究者間の討論と意見交換を重視するとともに、その成果をより多くの方々にご利用いただく出版活動にとり組んでおります。ここに発刊します IGE (Institute of Genetic Ecology の略) シリーズも、こうした努力

の一環であります。

本シリーズの内容は、多岐にわたる可能性をもっておりますが、3つのタイプに大きく類別されるだろうと考えております。すなわち、(i) 特定のテーマ、又はトピックについての解明に関するもの（\*印を付します）、(ii) 特定のテーマ又はトピックに関する最新の文献、実験法の紹介に重点をおくもの（\*\*印）、そして(iii) 新しい可能性を求める学際的交流、対話を試みるもの（\*\*\*印）であります。

このIGEシリーズが、多方面の方々のお役に少しでも立つことを願って、発刊の辞とします。

1999年3月

東北大学遺伝生態研究センター



## ❖ 目 次 ❖

はじめに	
南沢 究 .....	1
共生特異的代謝遺伝子群の発現解析と制御	
ーコミュニケーション機構解明から、根粒機能統合へー	
田島 茂行 .....	3
Saturation mutagenesis によるミヤコグサ根粒形成プログラムの細分化	
川口正代司 .....	17
根粒菌のライフヒストリー	
三井 久幸 .....	35
共生窒素固定系の硝酸阻害機構	
金山 喜則・岡村 好倫 .....	41
根粒菌の生産するリゾビトキシンの共生における役割	
安田 剛・遊橋 健一・市川 徳一・貫井 憲之・南沢 究 .....	49
アグロバクテリウムとバイジェリンキアに導入した根粒菌の遺伝子発現	
内海 俊樹・川村 亮一・阿部美紀子・鈴木 章弘・東 四郎 .....	63
<i>Streptomyces</i> 属放線菌のキチナーゼ遺伝子の構造と発現制御	
斉藤 明広・藤井 毅・米山 忠克・宮下 清貴 .....	75
熱帯 <i>Bradyrhizobium</i> 属根粒菌の遺伝的多様性	
横山 正・安藤象太郎・友岡 憲彦・Duncan A. Vaughan・土屋 健一 .....	89
土着ダイズ根粒菌の多様性と遺伝子再編成	
伊沢 剛・鮫島 玲子・南沢 究 .....	105
<i>Pseudomonas syringae</i> 群細菌におけるの病原性分化と適応進化	
澤田 宏之 .....	117
エンドファイトの農業利用と共生機構	
羽柴 輝良 .....	135
エンドファイトの耐虫性付与と宿主特異性機構	
古賀 博則 .....	145

イネ科植物に共生するエンドファイトの探索 篠崎 聡 .....	159
野生イネおよび栽培イネ在来品種のエンドファイト の探索 南沢 究 .....	167
有用根圏菌類による病害抑制：植物生育促進菌と菌 根菌 百町 満朗 .....	177

# はじめに

## 南 沢 究

地球生態系は、動物、昆虫、植物、微生物の間の多様な相互関係で成り立っています。現在の地球生態系は、その構成員である人類の存続をも危うくするほど破壊が進んでいるといわれる中で、様々なレベルの生物間相互作用の重要性が認識されはじめています。植物は微生物の充満した環境下で進化を遂げ、その過程で特定の微生物と寄生や共生の相互関係を繰り返しながら、今日の共生関係が進化してきました。これらの微生物の共生に関わる分子機構やその多様性を探ることは、生物共生の基本原則を理解するためにも、環境・食糧問題の解決の糸口をつかむためにも重要であります。IGE シリーズ本号は、平成 10 年 12 月 7 日、8 日に東北大学遺伝生態研究センターにおいて「微生物の共生戦略の分子機構と多様性」というタイトルで、植物と微生物の相互作用を様々な側面から取り上げるワークショップを行った成果をとりまとめたものです。おそらく、植物と微生物の相互作用の分子機構や共生微生物の多様性を広い範囲で取り上げたワークショップとしては初めての試みではないかと思われます。本ワークショップを企画するに当たって、「根粒菌とマメ科植物の共生機構」「共生・病原微生物の遺伝的多様性と適応進化」「共生微生物の多様性とその利用」の 3 つの柱を立てました。

根粒菌とマメ科植物の窒素固定共生系は、生物的窒素固定という農業上の有用な性質と細胞内共生による共生器官形成という明確な形質のため、昔から多くの研究者の関心の的になってきましたが、近年、様々な遺伝子発現等を介した相互作用の様々な分子基盤が明らかになりつつあります。根粒菌とマメ科植物の共生系は、細胞内共生という点でも、高い宿主特異

性という点で、珍しいものです。種々の共生系の比較により、植物の根圏に生息していた単生窒素固定菌が、ルーズな共生系から細胞内共生の方向へ、広い宿主域から狭い宿主域の方向へ、寄生から共生の方向へ進化してきた結果、現存の根粒菌が進化してきたと考えられています。したがって、根粒菌とマメ科植物の窒素固定共生系は、自然界における微生物と植物間の多様な相互関係を包含したモデル系と考えられます。そこで、最初に、根粒菌とマメ科植物の窒素固定共生系研究の現状やトピックの紹介をして頂きました。

マメ科植物と共生する根粒菌は属・種・菌株などのさまざまなレベルで実に多様ですが、根粒形成に関わる根粒菌側の遺伝子 (*nod* gene) は、水平伝播している分子進化学上の証拠が多数あります。共生・病原微生物は、宿主植物への特異的な感染という強い選択圧のために、共生・病原遺伝子群がセットとして挙動すること知られています。このように自然界では共生菌や病原菌の適応進化がダイナミックに起こっている可能性が指摘されています。微生物共生を考える場合、今後深めるべき重要な視点であると思われましたので、これらにかかわるトピックも紹介して頂きました。

根粒菌や典型的な植物病原菌以外に、植物は多様な菌類や細菌と「緩い」共生関係を保ちます。最近これらの微生物が、耐病性・耐虫性・生育促進作用を宿主植物に付与しているケースが明らかにされ、エンドファイト (Endophyte) と呼ばれています。植物に内生している微生物として、根粒菌の様に細胞内共生を起こす場合はまれで、むしろ細胞間隙などに緩く内生している場合が多いようです。おそらく、エンドファイトは様々な植物内に一大生物圏を形成していますが、器官形成や表現型が明確でないことや腐生菌との境界が曖昧なので、今まであまり研究の対象とされてこなかったものと思われます。今後、エンドファイトの世界を明らかにすると同時に、どのような切り口からそれらの共生の分子機構を探るかが課題であると思われます。そこで、エンドファイトの研究の現状やトピックの紹介をして頂きました。

最後に、お忙しい中、話題提供をして頂いた上に、IGE シリーズ本号のために脱稿して下さった方々に深く感謝いたします。

# 共生特異的代謝遺伝子群の 発現解析と制御

—— コミュニケーション機構解明から、  
根粒機能統合へ ——

田 島 茂 行

## はじめに

分子状窒素をアンモニアへ変換する酵素（ニトロゲナーゼ）を持つ根粒菌と、酵素反応に必要な大量の呼吸基質供給を受け持つマメ科植物との協同作用を実現させた共生窒素固定は、光エネルギーを使った炭酸固定系である光合成と同様に、農業的に重要な代謝系である。更に微生物が植物細胞内で営む共生現象の生物学的興味からも古くから研究されてきた。1960年代にはニトロゲナーゼ単離の成功を端緒とした生化学研究が急速に進み、ニトロゲナーゼの広い基質特異性や活性中心を人工的に模倣することによる人工酵素の作製が夢見られたが、1980年代からは Nod 遺伝子の発見、分子生物学的実験手法の発達により、より具体化した形で人工的に様々な非マメ科植物に共生系を実現する夢が語られた。この流れの上で、共生系という複雑な生物系は未解決の問題を多く後に残しながらも、両生物間のシグナル伝達、細胞分化機構の解明を目標とするレベルで多くの研究が行われ、共生系の実体についての知見が蓄積してきている<sup>1,2)</sup>。

Nod 遺伝子の発見以降すでに 20 年近く経過し、根粒菌感染後の組織形成プログラム、新規遺伝子発現の解析は、ゲノムプロジェクト、構造生物学の勃興とともに、新しい視点から研究の再構築が行われようとしている。21 世紀の持続的農業に必要な技術としても注目を集めており、この機会に、根粒特異的代謝系の遺伝子として解析されてきた一連の遺伝子群を再

整理し、我々の研究成果を織り交ぜて今後の研究展開の方向を考えたい。

## 1. 共生組織形成と窒素固定

表1に於いて根粒菌がマメ科植物根圏で増殖後、根粒形成に至る過程で関与すると考えられている過程、根粒菌及び植物側物質、遺伝子を上から下へ時間経過に従って列挙した。通常的生活型で恒常的に発現している部分は記述していない。この根粒組織形成過程については多くの優れた総説があるので、詳しい解説は紙面の関係からそちらを参考にさせていただきたいが、大まかな構成・機能分担が示されている。この根粒菌の感染と植物根での根粒形成・宿主特異性という複雑な生命現象が Nod 遺伝子と名付けられた1つの根粒菌複合遺伝子によって基本的に規定されているという驚くべき発見は、この Nod 遺伝子産物である Nod ファクターの実体が植物ホルモン活性を持つリポキチンオリゴ糖 (LCO) であり、この物質を適当

表1. 共生組織形成過程における微生物・植物細胞間相互関係

表現型	根粒菌側	植物側
根圏で増殖		ビオチンなどの菌増殖因子
菌 nod 遺伝子活性化		イソフラボンなど
菌 nod factor 放出	nod factor	
根毛カーリング (初期反応)	nod factor	複数のレセプター? レクチン (根毛細胞原形質流動, $\text{Ca}^{2+}$ , 濃度変化, アルカリ化 <sup>4)</sup> )
根粒原基・組織誘導	nod factor	cytokinins, Early nod 遺伝子群
菌の侵入	exo, exp, pss, per, ndv, lps, sxg, kps genes polygalacturonase <sup>5)</sup> , EPS, CPS, cyclic- $\beta$ -glucan	感染糸形成
サブレッサー	EPS?	
オートレギュレーション		植物ホルモン?
感染, 非感染細胞分化 (シンビオゾーム膜形成)		Late nod 遺伝子群
菌の植物細胞質への放出	バクテロイドへの分化	
ニトロゲナーゼ系誘導	nif, fix, cox genes (Nitrogenase 系)	
呼吸基質生産系誘導	DCT	MDII, PEPC, DCT,
固定産物輸送系誘導		GS, GOGAT, AS, AAT purine biosynthesis, uricase ammonia, ureide transporters?
老化		proteolysis
根粒崩壊	自由生活型への再分化	離層形成

上から順に感染後出現する表現型を表示。EPS; exopolysaccharides, CPS; capsular polysaccharides, DCT; dicarboxylate transporter

な濃度で根の組織に与える事によって根粒組織特有の構造及び ENOD40 などの初期 nodulin が誘導されるということで物質的に裏打ちされた。従って LCO が細胞内ホルモンと協同して根の内皮細胞脱分化、根粒原基形成につながる初期器官形成プログラムを活性化させると考えられている<sup>1-5)</sup>。一方、様々な植物根に一定の濃度範囲の 2, 4-D などの植物ホルモンを与えると根粒に似た組織形成が起こる事も知られており、このプログラムは比較的簡単な刺激で最初は活性化されると考えることが出来る。

しかし根粒菌の侵入、菌の細胞内共生、窒素固定発現につながる一連の現象は、LCO による組織形成よりかなり複雑なものとして考えることが出来る。このプログラムには、大まかに考えただけでも、根粒原基周辺でエリシター誘導・過敏感細胞死などの植物側感染抵抗性反応をすりぬけるか、仮に抵抗性反応が部分的に起こっても耐性になる分子機構<sup>5)</sup>、根粒原基の数を一定の範囲に押さえ込むオートレギュレーション機構、シンビオゾームを形成して植物細胞原形質内で根粒菌が共存するための機構、根粒菌のバクテロイドへの分化・ニトロゲナーゼ系誘導をおこなう分子機構、植物根からの光合成産物及び窒素固定産物を根粒菌・宿主組織間で輸送転流するための分子機構（根粒皮層細胞・感染細胞・非感染細胞の分化）、根粒組織の老化・崩壊・バクテロイドの自由生活型根粒菌への再分化につながる分子機構が存在するであろう。LCO により誘導される器官分化は、根粒菌感染による新たな器官再分化・再構成をへて、窒素固定活性を発現する新しい代謝系を持つ根粒組織へと発達して行くことになる。この過程の理解・制御には、この一連のプログラムの内容と制御因子を解析することが必要である。

ではこの過程はどのようなステップから構成されているのだろうか。

## 2. 共生窒素固定成立過程における遺伝子発現

### 1) 植物ゲノムへの突然変異導入による変異表現型解析

表 1 に示した器官形成過程に関与する物質・遺伝子または生物的過程を解析する手段として、遺伝学的アプローチがある。その有力な手法として、突然変異を植物または根粒菌ゲノム中でランダムに導入し、表現系や遺伝

子系の差を検出する試みがある。共生窒素固定系に関する植物側変異には sym という略称が与えられているが、以下に述べる様々な変異が報告されている(表2)。表でわかるようにエンドウとミヤコグサの報告例が多い。変

表2. 各種マメ科植物の主要な sym 一覧

< *Pisum sativum* >

sym1=sym2, sym2 Nod <sup>-</sup> , strain-dependent, nod <sup>-</sup> -factor perception site ?			
sym3	Fix <sup>-</sup>	sym4	Nod <sup>-</sup> , strain-dependent
sym5	low nodulation 2/177	sym6	Nod <sup>-</sup> , strain-dependent
sym7	Nod <sup>-</sup>	sym8	Myc <sup>-</sup> , Nod <sup>-</sup>
sym9	Myc <sup>-</sup> , Nod <sup>-</sup>	sym10	Nod <sup>-</sup>
sym11	Nod <sup>-</sup>	sym12	delayed nodulation
sym13	Fix <sup>-</sup>	sym14	Nod <sup>-</sup>
sym15	few nodules, short lateral roots	sym16	few nodules, short lateral roots
sym17	few nodules, short lateral roots	sym18	Nod <sup>-</sup> , strain-dependent
sym19	Myc <sup>-</sup> , Nod <sup>-</sup>	sym20	Fix <sup>-</sup>
sym21	low nodulation	sym22	
sym23	Fix <sup>-</sup>	sym24	Fix <sup>-</sup>
sym25	Fix <sup>-</sup>	sym26	Fix <sup>-</sup>
sym27	Fix <sup>-</sup>	sym28	
sym29		sym30	Myc <sup>-</sup> , Nod <sup>-</sup>
sym31	Fix <sup>-</sup>	sym32	
sym33	Fix <sup>-</sup>	sym34	
sym35		sym36	
sym37		sym38	
sym39		sym40	Fix <sup>-</sup>
nod1	lownodulatdon	nod2	low nodulation
nod3	hypernodulating		

< *Vicia faba* >

sym1	Nod <sup>-</sup> , Nod <sup>-</sup> Fix <sup>-</sup> , strain dependent
------	---

< *Medicago truncatula* >

sickle	hypernodulating	domi	non-nodulating
TE7	fix <sup>-</sup>		

< *Phaseolus vulgaris* >

ntsn	Pvb <sup>-</sup> Fix <sup>-</sup> , Myc <sup>-</sup>
------	--



表 2. つづき

< *Glycine max* >

rj1	nod <sup>-</sup> , strain-dependent	Rj2	Fix <sup>-</sup> , strain-dependent
Rj3	Fix <sup>-</sup> , strain-dependent	Rj4	Fix <sup>-</sup> , strain-dependent
ntsl	hypernodulating		

< *Lotus japonicus* >

sym1	Nod <sup>-</sup> , Ami <sup>+</sup>	sym2	Nod <sup>-</sup> , Coi <sup>-</sup>
sym3	Nod <sup>-</sup> , Coi <sup>-</sup>	sym4	Nod <sup>-</sup> , Coi <sup>-</sup>
sym5	Nod <sup>-</sup> , Ami <sup>+</sup>	sym6	Fix <sup>-</sup>
sym7	Fix <sup>-</sup> , Ami <sup>+</sup>	sym8	Fix <sup>-</sup>
sym9	Fix <sup>-</sup>	sym10	Fix <sup>-</sup>
sym11	Fix <sup>-</sup>	sym12	Fix <sup>-</sup>
sym13	Fix <sup>-</sup> , Ami <sup>+</sup>	sym14	Fix <sup>-</sup> adventitious root <sup>+</sup> , Ami <sup>+</sup>
sym15	low nodulation	sym16	Nod <sup>++</sup> , Ami <sup>+</sup>
sym20	Nod <sup>-</sup> , Mid protein homolog	sym21	Nod <sup>-</sup> , Myc defective
sym22	Nod <sup>-</sup> , Myc defective	sym23	Nod <sup>-</sup> , Myc defective
sym24	Nod <sup>-</sup> , Myc defective	sym25	Nod <sup>-</sup>
sym26	Nod <sup>-</sup>	sym27	Nod <sup>-</sup> , *leaky nodulation
sym28	Nod <sup>-</sup> , *leaky nodulation	sym29	
sym30	Fix <sup>-</sup> , Myc defective	sym31	Fix <sup>-</sup> /+
sym32	Fix <sup>-</sup> /+	sym33	Nod <sup>-</sup> /+, Fix <sup>-</sup> /+
sym34	Harl, Nod <sup>++</sup> =sym16	sym70	Nod <sup>-</sup> , Ami <sup>+</sup>
sym71	Nod <sup>-</sup> , Coi <sup>-</sup>	sym72	Nod <sup>-</sup> , Coi <sup>-</sup> ?
sym73	nod <sup>-</sup> (low nodulation)	sym74	Hist <sup>-</sup> (alb 1), Ami <sup>+</sup>
sym75	Fix <sup>-</sup>	sym76	Fix <sup>-</sup> (fen 1), Ami <sup>+</sup>
sym77	dcn (dark complexioned nodules)		
sym78	Nod <sup>++</sup>	sym79	Hist <sup>-</sup> (distorted segregation)

(東京大学大学院川口正代司博士, 愛知教育大学菅沼教生助教授の好意により記載; Fix<sup>-</sup>変異についてはNorio Suganuma (1999) Current Topics in Plant Biology, in pressを参照)

Fix<sup>-</sup>は窒素固定活性欠損, Nod<sup>-</sup>は根粒形成能欠損, Nod<sup>++</sup>はスーパーノジュレーション, Hist<sup>-</sup>はNod<sup>-</sup>とFix<sup>-</sup>の中間に位置する根粒内の組織分化 (Nodule histogenesis) 欠損変異, Coi<sup>-</sup>はCortex Invasionできないことを意味 (実際はCoi<sup>-</sup>であってもわずかに樹枝状態を形成), Ami<sup>+</sup>は菌根の感染が正常のものであり, Arbuscular Mycorrhiza Interactionに由来, Myc<sup>-</sup>はミコリザ感染能に由来している。

異は当然様々な形質に起こるが、窒素固定研究者の関心は根粒形成や窒素固定活性である場合が多いので、その様な sym が記述されている。例えば Fix<sup>-</sup>変異では、異なった突然変異部位が関与していることがわかる。この変異体は貴重な実験材料であるが、問題は sym が EMS などによる突然変異誘導で作られる場合が多く、古典的解析しかできない場合が多い。つまり、この変異がどのような遺伝子に起因するのか、ほとんどわかっていないことである。

川口らは、sym 変異について興味ある総説を発表しており、詳しくはそちらを見ていただきたいが、sym 変異の発生率が比較的高いことから根粒形成に関与する遺伝子の数は比較的多いのではないかと考えている（例えば 100 遺伝子という数字を挙げている）<sup>2,3)</sup>。

### 3) 共生組織形成過程における新規遺伝子発現

変異体作成とは別のアプローチに、共生器官誘導時に特異的に発現する遺伝子を探索する手法がある。このような共生特異的植物遺伝子を nodulin とよぶが、根粒菌感染後数時間から 2,3 日程度で発現してくる early nodulin (Enod) と、数日後根粒形成が目で確認できる程度の時間で

表 3. 主要な Early Nodulin 遺伝子群

遺伝子名	発現組織	遺伝子産物の分子的性質
Enod 2	inner cortex	Hypro-rich cell wall protein
Enod 3	infected cell	cystein-cluster
VfEnod-GRP3	interzone II-III	glycine-rich protein
MtPRP 4		prolin-rich protein gene family
Enod 5	infected cell	cell wall arabinogalactan protein
PsEnod 7	interzone II-III	
Enod 8		glycoprotein (APG in Arabidopsis?)
Enod 10		
Enod 12	epidermis	HyPro-rich cell wall protein
Enod 40	pericycle	dedifferentiation of cortical cells
Enod 55	infected cell	
GmN 70	infected cell	PBM protein
GmN 93	infected cell	

PBM; peribacteroid membrane

表 4. 主要な Late Nodulin 遺伝子群

遺伝子名	表現組織	遺伝子産物の分子的性質
Lbs nodule specific actin gene	infected cell	Oxygen carrier
P450 Carbonic anHase malate dehydrogenase PEPC PEPC kinase	premordium	lotus EST controlled by Rhizobium
AAT-2 GS GOGAT	infected cell	amyloplast
Nod 3	infected cell	
Nod 6	uninfected cell	
LjNod 16	infected cell	
Nod 20		
Nod 22		
Nod 23	PBM	
Nod 24	PBM	gly, his-rich protein
agN84/ag164	PBM	
Nod 26	PBM	water channel (aquaporin)
GmSAT1	PBM	ammonia transporter?
Nms 25		
Nod 30	uninfected cell	
Nod 32		chitinase?
Nod 35	uninfected cell	uricase, cell differentiation?
Nod 44		
Nod 45		hydrophilic protein
GmN 56	infected cell	isopropylmalate synthase, homocitrate synthase?
Nod N75		extensin?
Nod 100	cytosol	sucrose synthase
Nod 100		kinase

PBM; peribacteroid membrane

発現してくる late nodulin に大別される。Enod は根粒形成の初期過程に関与していると考えられ最近多くの関心を集めている。late nodulin は根粒菌感染後の新しい代謝機能誘導に関連していると考えられている。late

nodulin の幾つかは発現量が非常に多く、最初に報告された nodulin は、leghemoglobin (Lb) と uricase である。

根粒菌の場合は *exo*, *exp*, *pss*, *psr*, *ndv* らの安定な共生組織形成に必要な遺伝子群, *nif*, *fix* などの窒素固定活性誘導に必要な遺伝子群が共生関連遺伝子として単離, 解析されている。

表 3, 4 に現在報告されている主な nodulin 一覧を示したが, Enod のほとんどは膜系構成タンパクであったりして機能が不明確である。Late nodulin も生理的解析により推定される酵素遺伝子群をスクリーニングする場合と, differential screening, subtraction 法のように比較したい組織同士の発現 mRNA を比べる場合がある。酵素遺伝子として確認されている場合を別として, クローニングした mRNA がデータベースで同定できないときは, その遺伝子の機能は確認できず in situ 解析などにより発現時期, 組織を調査し, 出来れば anti sense 手法により遺伝子発現を減少・増幅した場合の表現型変化を調べることになる。従って表には酵素名が記載されている場合と, 番号のみが示されている場合がある。最初は番号だけが報告されても, 後に別の系でホモロジーが高い遺伝子が報告され機能が推定される場合もある。例えば late nodulin の Nod26 が, 後にアミノ酸配列の相同性が極めて高いことから水チャンネルと推定された事例がある。

#### 4) 根粒組織における代謝系酵素遺伝子発現

これまで述べてきた遺伝子解析はどのように総合化されるのだろうか。根粒組織が形成されると, 根粒皮層細胞, 感染域の非感染細胞, 感染細胞, 感染細胞中の symbiosome, バクテロイドとそれぞれの細胞, 組織が分化し, 特殊化した代謝系を誘導する。これらの代謝系は生化学的にある程度解析されており, 遺伝子発現との関連も報告され始めている。

バクテロイド代謝に於いては, ニトロゲナーゼと低酸素分圧に対応した酸化リン酸化の系が特異的に誘導されてくる酵素系として有名である<sup>6)</sup>。呼吸系としては菌体内スクロース合成酵素などの解糖系が suppress され, overflow pathway ともいわれる様々な分岐を持つ TCA 回路が機能していると報告されている。これらの TCA 回路分岐によりトレハロースなどの糖アルコール, poly-hydroxy-b-butyrates, g-aminobutyric acid 等

のストレス物質を蓄積するバクテリアの炭素代謝に関しては不明な点が多いが、エネルギー代謝系としての効率改善に向けて遺伝子突然変異導入を用いた研究が行われている。最近では根粒菌の mRNA をバクテロイドのものと比べる実験も行われており、バクテロイド分化の分子機構解明に向けての研究が進んでくると思われる。

植物側では、代謝系酵素 nodulin としては、表 4 に示すようにバクテロイドの呼吸基質であるリンゴ酸などの C4-ジカルボン酸生合成系がある。光合成産物であるスクロースからリンゴ酸を生合成するために必要な酵素群である sucrose synthase (nodulin 100)<sup>1,6)</sup>, phospho-enol-pyruvate carboxylase (PEPC)<sup>7)</sup>, PEPC kinase, malate dehydrogenase (MDH)<sup>8)</sup> が nodulin として検出されてきている。これらの酵素は非共生状態でも存在しているが、根粒では発現増幅がかかっていることが発見された。特に MDH アイソザムの一つは根粒でのみ検出されたと報告されている。carbonic anhydrase も nodulin として報告されているが、代謝的な意味は不明である。

窒素代謝に関してはニトロゲナーゼの反応生成物であるアンモニアを同化するための glutamin synthetase (GS)<sup>1,2,6)</sup>, glutamate synthase (GS/GOGAT 系酵素)<sup>9,10)</sup> が nodulin として報告されている。更にアミド型根粒に於いて転流態窒素化合物を作るための asparagin synthetase (AS)<sup>11)</sup> や asparagin amino transferase (AAT)<sup>12)</sup> が、ウレイド型根粒に於いてはプリン生合成酵素、ウリカーゼ (Nod 35)<sup>13,14)</sup> も nodulin であり発現増幅する。このように C 代謝と N 代謝の遺伝子群が発現増幅する事実が蓄積してきたことから、C/N 代謝相関も新しいレベルで解析されることと思われる。

##### 5) Late nodulin としてのウリカーゼ遺伝子発現

Late nodulin として根粒中で発現量の一番多いのはレグヘモグロビン (Lb) であるが、ウリカーゼ (Nod 35) はもっとも早く nodulin として同定され、典型的 nodulin と考えられてきた遺伝子である。筆者らは、ダイズ根粒が窒素固定産物をアラントイン、アラントイン酸などのウレイドで地上部に輸送する現象に興味を持ち、この代謝系が根粒内で窒素固定開始後

特異的に誘導されることを報告した。植物でウレイドを高濃度に蓄積する種は幾つかあるが、窒素固定などの細胞内窒素供給によって、植物の元々持っている窒素代謝経路を大きく変化させるのは非常に珍しい現象である。ダイズ植物が窒素施肥によって根粒を付けなくても正常な発育を遂げることから、アラントインはダイズ植物にとって必須な栄養物質でないことは容易にわかる。アラントイン生成はアミド生成に比べ多くのエネルギーを生合成に使うので、アラントインの C/N 比が大きく光合成産物の節約になるとはとっても合目的性に欠けると思われる。なぜダイズは他のマメ科植物と同様にアスパラギンなどのアミドを転流物質としないのであろうか。マメ科植物では多くの種がアスパラギンなどのアミドを転流用の固定窒素産物としており、ウレイドを転流するのは *Vigna*, *Glycine*, *Phaseolus* sp. など一部である<sup>6)</sup>。これらのマメ科植物は皆 determinate type (丸い根粒を付ける) であるが、determinate でもアミド型の *Lotus japonicus* などがあり、determinate type の一部がウレイド転流型に進化していったように見える。

ウレイド型とアミド型マメ科植物のウリカーゼが異なるのかどうか比較するために、アミド型のマメ科植物と考えられるアルファルファのウリカーゼ遺伝子を cDNA ライブラリーからクローニングした。DNA プローブは degenerated primer を用いた RT-PCR を行い、調製した。アルファルファ cDNA ライブラリーから *MsM2*, *MsM9* と名付けた二つのウリカーゼ cDNA クローンが得られ、アミノ酸配列はダイズのウリカーゼと強い相同性を示しながらも系統樹をアミノ酸配列から作製するとダイズとははっきりと異なった分岐を示した(図 1)。この cDNA クローンの発現を調べたところ、様々な器官で発現しており根粒で特に強く発現しているということではなかった(図 2)。しかし *in situ* hybridization の結果はウリカーゼクローンは根粒では感染域の非感染細胞で発現していることをはっきり示していた。

この結果は窒素代謝タイプが異なっているにも関わらずウリカーゼ発現は根粒内では同じ細胞タイプ、非感染細胞特異的に起こっており、そのための *cis*-element, *trans*-factor の組み合わせは全てのマメ科植物に存在

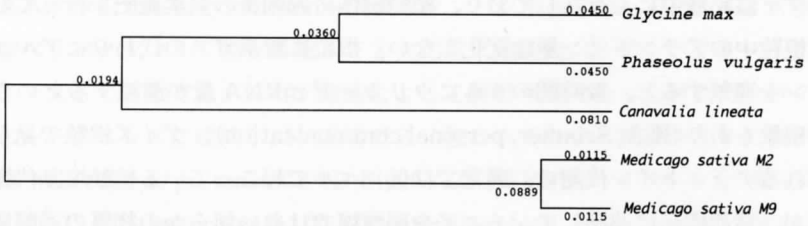


図1 Phylogenetic tree of various legume uricases  
ウレイド型マメ科植物 (ダイズ; *Glycine max*, ササゲ; *Phaseolus vulgaris*)  
中間型マメ科植物 (ナタマメ; *Canavalia lineata*)  
アミド型マメ科植物 (アルファルファ; *Medicago sativa*)

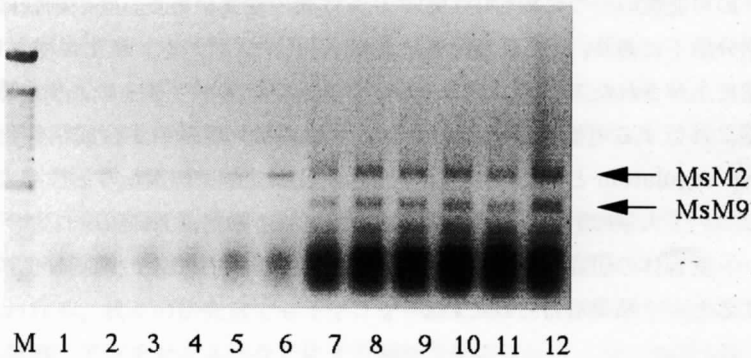


図2 RT-PCR analysis of various *Medicago sativa* tissues for detecting *MsM2* and *MsM9* transcripts.  
M: MW marker, 1-6: low PCR cycle, 7-12 high PCR cycle, 1, 7: nodules, 2, 8: seedlings 3, 9: stem, 4, 10: leaves, 5, 11: flowers, 6, 12: roots

している可能性がある。このウリカーゼアミノ酸配列を様々なマメ科植物で比較すると、アミド型とウレイド型のウリカーゼははっきりと分岐する(図2)。一方、RuBisCoのlarge sub-unitのアミノ酸配列から作製したマメ科植物の系統樹もウレイド型マメ科植物は大きく見るとグループを形成しており、determinate型アミド型根粒を持つマメ科植物からの進化上の分岐を示唆している<sup>15)</sup>。

ダイズに比べて数パーセントレベルの極微量アラントインはアルファル

ファ溢分泌液中にも存在しており、植物個体に過剰量の窒素施肥を行っても根粒中のアラントイン量は変化しない。根粒に窒素ガスの代わりにアルゴンを通気すると、数時間のうちにウリカーゼ mRNA 量が激減するという現象もあり (K.A. Schuller, personal communication), ダイズ根粒で見られるアラントイン代謝は、通常では低レベルで起こっている核酸塩基代謝が、窒素固定に連動しアンモニアや硝酸塩ではない何らかの物質の過剰発現により誘導されることを意味している。また過剰のアラントイン蓄積は窒素固定活性を阻害するという意外な結果も報告されている<sup>16)</sup>。このような必ずしも不活性物質ではないアラントイン蓄積現象を引き起こす、どのような変化が進化の過程で引き起こされたのであろうか。

その可能性の一つに根粒中でのプリン代謝の変異がある。感染細胞は低酸素分圧下にあり、解糖系の促進により ATP やアデノシン産生が増大し、多量に生産されたアデニンがヌクレオシドトランスポーターにより非感染細胞に移行する可能性がある。このようなプリン塩基の生合成活性化と down regulation としてのウリカーゼのような分解系酵素転写活性増大が結びついて大量のアラントイン生産が起りうる。動物 T 細胞の系ではアデノシン受容体の研究からアデノシン濃度の変化が免疫機能、細胞分化に関連するという結果も得られている<sup>17)</sup>。

### 3. シグナル伝達から根粒機能統合への解析

根粒内で誘導される遺伝子発現は、LCO や根粒菌感染からのシグナル伝達により引き金を引かれる。この遺伝子発現ネットワークの解析は始まったばかりであるが、器官形成と代謝誘導など様々な視点から研究が進んでいる。特にサイトカイニンなど植物ホルモンの関与が想定されているので、シグナル伝達関与のダウンレギュレーションの解析が光合成系機能統合との類似性を利用して進んでいくと思われる<sup>18)</sup>。

共生特異的代謝の上でもっとも解析の進んでいる Lb 遺伝子のプロモーター領域に結合するタンパク、GmLAF1 は同定が進んでいるし、ミヤコグサのホモログ Ljlaf1 も取られてきている<sup>19)</sup>。このような生化学的研究はプロテオーム解析の方向にも進んでおり、Udvardi らは感染細胞での代謝の



基本的単位である symbiosome 膜表面タンパク解析を行った<sup>19)</sup>。ダイズ根粒ペリバクテロイド膜を単離して2次元電気泳動後、26 タンパクをシークエンスして、殆どはタンパク修飾によって解析不能であったが7 タンパクのシークエンスに成功し、N-末端アミノ酸のホモロジー検索によって分子量 95 kD serine protease, 75 kD Bip, 65 kD HSP60 (シャペロン), 60 kD PDI, 35 kD cys-protease, 30 kD extensins (cell wall protein), 26 kD nodulin 26B を推定した。

sym 変異の分子的解析が、ミヤコグサなどのモデルマメ科植物での Ac タグging の成功、染色体マッピング、BAC, PAC 等による大規模遺伝子ライブラリーの作製、大規模 EST 解析などにより進み始めている。特にデンマークの Staugaard らのグループは大規模な Ac トランスポゾンタグging をミヤコグサで実行しており、既に Ac タグラインの中から幾つかの Nod-変異体を得ている。その中で彼らはミヤコグサの sym20, sym16 に相当する遺伝子の同定にほぼ成功しており、sym20 については cDNA クローニング、遺伝子産物の確認も行われている<sup>19)</sup>。

今後は根粒内代謝機能を理解するために、共生工学利用の可能性も含めてモデル植物を使った構造生物学的アプローチが必要になってくるものと思われる。我々の研究室でもミヤコグサなどモデル植物の代謝機能遺伝子の単離、アンチセンス法などによる解析を始めている。単一の研究室では解析手段が維持できない場合が多いので、共同研究の必要性を強調して文を終わりたい。

#### 4. 謝 辞

本総説を書く機会を与えて下さった東北大学南澤 究教授、共同研究者である香川大学農学部東江美加博士、農水省生物研河内 宏室長、同高根建一博士、sym 変異の資料を戴いた東京大学大学院川口正代司博士、エンドウ突然変異体の情報をくださった愛知教育大学菅沼教生助教授、未発表原稿を送って下さったミネソタ大学教授 C. Vance 教授、フランス国立植物研究所 A. Kondorosi 博士に感謝いたします。

## 参考文献

- 1) 河内 宏 (1997) 山田哲治, 島本 功, 渡辺雄一郎編, 細胞工学シリーズ 8, 秀潤社, 1997, p 28
- 2) 川口正代司, 河内 宏 (1998) 根粒菌とマメ科植物の共生窒素固定, 化学と生物 36 : 820-825
- 3) 川口正代司 (1998) 日本土壤肥料学雑誌 69 : 310-315
- 4) Felle, H.H. et al. (1998) The Plant J. 13 : 455-463
- 5) Munoz, J.A. et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. 95 : 9687-9692
- 6) Tajima, S. and H. Kouchi (1996) In The Plant-Microbe Interaction. vol. 2, ed. G. Stacey and N.T. Keen, Chapman & Hall, New York, p. 27-60
- 7) Pathirana, M.S. et al. (1997) The Plant J. 12 : 293-304
- 8) Miller, S.S. et al. (1998) The Plant J. 15 : 173-184
- 9) Temple, S.J., Vance, C.P. and Gannt, J.S. (1998) Trends in Plant Science 3 : 51-56
- 10) Trepp, G.B. et al. (1999) Plant Physiol. 119 : in press
- 11) Shi, L., et al. The Plant Cell 9 : 1339-1356
- 12) Yoshioka, H. et al. (1999) Mol. Plant Microbe Interactions 12 : in press
- 13) Takane, K., Tanaka, K., Kouchi, H., Okazaki, H. and Tajima, S. (1997) Plant Cell Physiol. 38 : 149-154
- 14) Takane, K., Tajima, S. and Kouchi, H. (1997) Molecular Plant Microbe Interact. 10 : 735-741
- 15) Doyle, J.J. et al. (1997) American J. Botany 84 : 541-554
- 16) Serraj, R. et al. (1999) Plant Physiol. 119 : 289-296
- 17) 小柴賢洋 (1999) 蛋白質核酸酵素 44 : 263-269
- 18) 杉山達夫 (1998) Nippon Nogeikagaku Kaishi 72 : 145-151
- 19) Abstract of First International Lotus Japonicus Workshop, 1998

# Saturation mutagenesis による ミヤコグサ根粒発生プログラムの 細分化

川 口 正代司

---

## 1. Saturation mutagenesis (突然変異飽和法)

saturation mutagenesis(突然変異飽和法)は、ある生物の形質に着眼し、そこに関わる変異体を可能な限り単離し、その形質を統御するすべての遺伝子座を同定するという実験的手法である。アレリズムテストあるいは染色体マッピングにより新しい遺伝子座が見出せなくなる段階になれば、変異はほぼ飽和したと考える。さらに変異体同士の交配から2重3重の変異体を作成し、その表現型を解析することによって、遺伝子間の上下関係、相互作用、さらには遺伝子ネットワークを明らかにすることができる。一つの変異体からその原因遺伝子をクローニングし、遺伝子産物の構造・機能を詳細に解析する方法とは異なり、saturation mutagenesis は未だ解明されていない生物現象、例えば発生プログラムの全体がどのくらいの遺伝子によって、またどのように制御されているかの全体像を把握する上で効果的である。タギングやポジショナルクローニングによる原因遺伝子のクローニングを通して生物現象に切り込むスタイルを、例えて虫が観た森の姿、虫観図とするならば、saturation mutagenesis はさしずめ森の全体構図を捉えようとする点で鳥瞰図ということができる。

saturation mutagenesis はショウジョウバエの胚発生プログラムの解明において最大の成果をあげた<sup>1)</sup>。幸運なことにショウジョウバエの胚発生の場合、それを制御する遺伝子数は約20ほどで決定されていた。得られた変異体をクラス分けし、さらに遺伝子の上下関係を遺伝学的に解析することにより、Nüsslein-Volhard (この高名な女性研究者の名前を耳にすると

筆者は真っ先に saturation mutagenesis のことを思い出す) と Wieschaus は遺伝子が胚に区切りをいれ体節を形成していく過程の筋書きを描くことに成功した。以後それぞれの原因遺伝子がクローニングされていくと、描いた筋書きはタンパク・RNA 等の分子の言葉で再度説明されていくことになる。具体例の一つ示すことにする。

あらゆる生物の発生過程は「勾配」の形成から開始される。しかしながら、morphogen の「勾配」の形成は発生生物学者に古くから語られてきたものの、その実体は空想の域をでなかった。1988 年 Driever と Nüsslein-Volhard は胚の前後軸を決定するピコイドタンパクの胚における局在を調べ、このタンパクが実際胚の前端から後方にかけて美しい濃度勾配を形成していることをはじめて示した<sup>2)</sup>。これは発生研究において長年語られていた概念にはじめて分子的説明を与えた歴史的な研究である。

この Nüsslein-Volhard 博士、その勢いはとまらず、無脊椎動物のモデル、ショウジョウバエから次は脊椎動物のモデル、ゼブラフィッシュに転じて再度 saturation mutagenesis を試みている。1996 年に刊行された Development 誌 123 巻はゼブラフィッシュ特集であり、そのほとんどの研究は彼女のチームの貢献である<sup>3)</sup>。特集号の表紙にはゼブラフィッシュの尻びれの模様を異にする多くの変異体がパネル状に示されている。このように saturation mutagenesis は、ある形質に着眼して変異体を新しい遺伝子座が見つからなくなるまで単離するという地道な試みによってなされる方法である。

## 2. Saturation mutagenesis によるミヤコグサ根粒発生プログラムの細分化の試み

「根粒」は根粒細菌との相互作用により誘導される共生的窒素固定器官であり、環境に適応した植物に特有の post embryonic development の好例である。根粒の優れた点は、その発生をめぐる正の制御因子（根粒細菌の感染、Nod factor）と負の制御因子（化合物窒素）が明確であることである。過去の根粒共生系の解析は、主に根粒細菌側の共生遺伝子群、すなわち *nod*, *exo*, *lps*, *fix*, *nif* 遺伝子等の根粒形成や感染糸形成、窒素固定発現

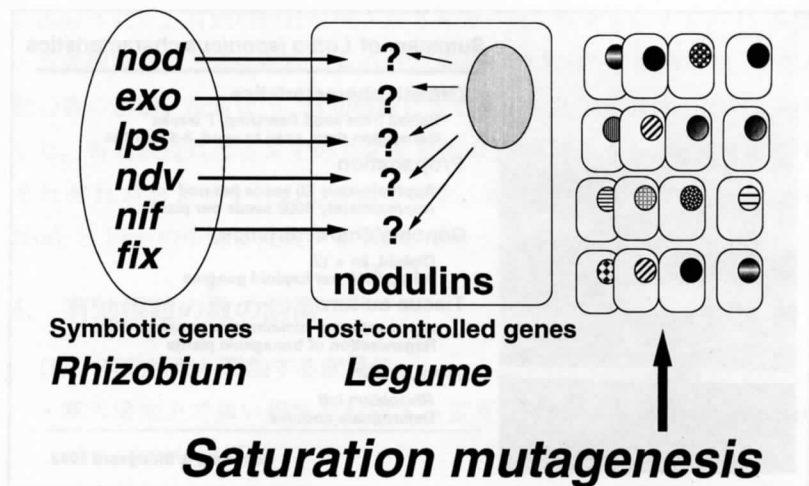



図1 未解明の根粒共生系をコントロールする宿主因子群と Saturation mutagenesis の導入

に関わる遺伝子群の機能解析において顕著な進展を見せた。しかし対称的に、それらと対をなす宿主側の根粒形成を制御する発生プログラムや Nod factor の受容からのシグナリング経路等はほとんど未解明である (図1)。根粒形成時に発現する多くの nodulin 遺伝子がクローニングされているが機能の不明なものが多い。そこでわれわれは saturation mutagenesis を根粒共生系について行い、根粒共生系を制御する宿主因子群の全体像に光をあてることを試みた。筆者らの用いた植物材料は1992年デンマークの分子遺伝学者 Handberg と Stougaard によってはじめて脚光を浴びた日本の岐阜県由来のミヤコグサ *Lotus japonicus* というマメ科の草本である。彼らはその論文において、この植物が、4倍体で自家不和合の西洋ミヤコグサ *Lotus corniculatus* と異なり、2倍体で自家和合であり、ゲノムが小さく、*Agrobacterium* による遺伝子導入が可能という分子遺伝学的解析に好適な形質を有していることを記載している<sup>4)</sup> (図2)。



**Summary of *Lotus japonicus* characteristics**

---

**Growth characteristics**  
 Period from seed flowering, 7 weeks  
 Generation time, seed to seed, 3-4 months

**Propagation**  
 Approximately 20 seeds per pod  
 Approximately 6000 seeds per plant

**Genome characteristics**  
 Diploid,  $2n = 12$   
 0.5 pg DNA per haploid genome

**Tissue culture**  
*Agrobacterium tumefaciens* transformation  
 Regeneration of transgenic plants

**Nodulation**  
*Rhizobium loti*  
 Determinate nodules

---

Handberg & Stougaard 1992

図2 ミヤコグサ *Lotus japonicus* とその特徴

### 3. 根粒共生系 vs 就眠運動

*L. japonicus* Gifu B-129 の 8,000 種子に EMS で変異を導入し、約 4 万の M2 種子から少なくとも M4 世代まで形質が安定に遺伝する 32 系統の共生変異体を単離した（最終的には約 5 万の M2 種子すべてを用い、約 50 系統の共生変異体を単離している）。筆者らは同時に根粒共生系と同じくマメ科植物に特徴的な形質である就眠運動の変異体の単離を平行して行った。就眠運動に関しては 4 万の M2 種子からのスクリーニングで、夜になっても就眠運動できない変異体 *sleepless 1* を単離したが、それはわずか 1 系統しか単離されなかった。少し脱線するがその変異体は小葉枕における膨圧やサーカディアンリズムに異常をしめす変異体ではなく、小葉枕が小葉柄のように転換し失われた変異体であった。変異によって先祖返りが生じている可能性が高い。ともかく就眠運動に関わる変異体の単離頻度と比較した場合、根粒形成に関わる変異体の単離頻度は明らかに高かった。およそ 1,000 個の M2 種子のスクリーニングから 1 つの共生変異体が得られるという高い頻度であった。根粒形成の変異体は大きく 2 つのカテゴリー

に区分された。有効根粒は形成されるものの数に異常を示すもの (5 系統) と有効根粒に至る発生過程のもの (27 系統) であった。前者は 4. 有効根粒の数の制御, 後者は 5. 有効根粒に至るまでの共生変異体の項目に記載した。有効根粒に至るまでの共生変異体の 27 系統のうち Nod- と Fix- はそれぞれおよそ 3 分の 1 しめていた。後述するが残りの 3 分の 1 は Nod- と Fix- の中間に位置する Hist- であった。

#### 4. 有効根粒の数の制御

##### (1) 有効根粒が増加する変異体

- ・寒天培地上で黒い根粒を形成する変異体 dark-complexioned nodules, *dcn* (*sym77*)

この変異体は根粒菌を感染させる以前に下胚軸伸長の光感受性が弱っており, 野生型よりも長くなる。また側根の重力屈性も弱くなってっている (図 3a)。表現型は *Arabidopsis* の *hy5* 変異体に酷似している。*hy5* の場合側根が野生型よりも早くでてくるが, ミヤコグサのこの変異体の場合, 側根形成にはあまり影響は認められないが根粒細菌を感染させると根粒が野生型より多く着生する (図 3b)。*hy5* の原因遺伝子はすでにクローニングされており, bZIP モチーフをもった転写因子をコードしている。遺伝子産物を過剰発現させると側根の形成が阻害されることから細胞分裂の負の制御因子として機能することが示唆されている<sup>5)</sup>。ミヤコグサの場合, 野生型の根粒は寒天プレート上で感染させると色素体の発達によりグリーンニングするが, この変異体はグリーンニングしない。このことから変異体の光感受性が失われていることが示唆される。面白いことに変異体の根粒は黒変することがしばしば認められる (図 3i)。変異体の名前 dark-complexioned nodules, *dcn* はこれに由来する。

劣性の 1 遺伝子支配の変異体である。

- ・根粒過剰着生変異体 *sym78*

この変異は典型的な根粒過剰着生変異体である。根粒菌の感染により, 植物の生長は過剰な根粒の着生のために顕著に阻害される (図 3c)。今までに報告されている過剰着生変異体は硝酸耐性であると報告されている。そこ

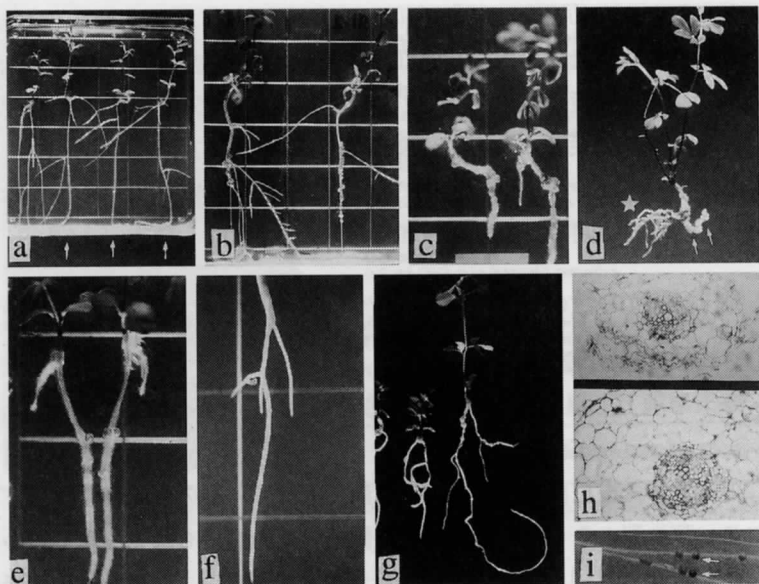


図3 有効根粒の数に関わる変異体

a, *dcn* 変異体 (右側の3個体, 左の1個体は野生型); b, *dcn* 変異体に根粒細菌を感染させたもの (右, 左は野生型); c, 根粒過剰着生変異体 *sym78*; d, *sym78* をはじめ窒素飢餓条件で育て根全体に根粒を誘導したのち (矢印) 窒素が十分含まれた培地で生育させた実生。星印は窒素存在下で発生してきた側根で根粒は着生していない; e, 野生型の根粒; f, 根毛のない *slp* 変異体; g, *tsr* の表現型を示す *ror1* 変異体 (左, 右は野生型); h, *ror1* 変異体の根の横断面 (上段野生型, 下段 *ror1* 変異体); i, *dcn* 変異体で誘導された黒い根粒 (矢印)。

で根粒形成における  $\text{KNO}_3$  の影響を観察したが、顕著な硝酸耐性は観察されなかった (図 3d)。また根粒菌が存在しない場での側根の数は若干増加している程度であることからミシガン州立大の単離した根粒及び側根が共に多い *sym34* とは表現型が異なっている<sup>6)</sup>。*sym34* は Stougaard が単離した *sym16* の新たなアリールであった。現在我々の単離した2系統の根粒過剰着生変異体と *sym16* とのアレリズムテストを進行中である。

*sym78* は劣性の1遺伝子支配の変異体である。



## (2) 有効根粒が減少する変異体

- ・根毛欠損の変異体 *slipping root, slp*

着生する根粒数が減少する low nodulation のミュータントとして単離された。実生の根粒を観察する場合、土やバーミキュライトに植えた植物を引き抜いて根粒の着生状況を調べる。この変異体は他のどの変異体と比較しても抜けがよく「するり」と抜ける。根を観察したところ根毛がほとんど完全に失われていた (図 3f)。

劣性の 1 遺伝子支配の変異体である。

- ・tsr に似た根をもつ変異体 *radial organization1, ror1*

根全体に共生細菌の Nod factor を添加すると、太く短い根 thick and short roots, tsr が誘導される。この変異体はもともと根粒菌を感染させる以前より tsr の表現型である (図 3g)。地上部の茎が太く短くなっており、地上部から seedlings を観察すると葉は反時計回りにねじれている。根端から 1 cm のところの根を横断してみると、皮層組織や中心柱を構成する細胞数が野生型よりも増大している。その結果根の放射構造 (radial organization) が野生型よりもかなり大型になっている (図 3h 下段、上段は野生型)。根粒の形成の場である根の放射構造の異常が根粒形成効率の低下を招いたと考えられる。この変異体と形質の似たものはエンドウの *sym17* であるが<sup>7)</sup>、我々はこれを共生変異体とはせず、放射構造の変異体として扱うことにした。

劣性の 1 遺伝子支配の変異体である。

## 5. 有効根粒に至るまでの共生変異体

有効根粒にまで至る発生過程の変異体は大きく Nod<sup>-</sup>、Hist<sup>-</sup>、Fix<sup>-</sup>に分離された。27 系統の変異体から発生過程を代表する 7 遺伝子を同定した。Hist<sup>-</sup>とは今回ミヤコグサの変異体の表現型を詳細に観察した結果新たにもらった根粒の組織形成、Nodule *histogenesis* における変異体であり、Nod<sup>-</sup>と Fix<sup>-</sup>の間の発生過程に位置するものである。7 遺伝子座の内訳は Nod<sup>-</sup>に 3 遺伝子座、Hist<sup>-</sup>に 1 遺伝子座、Fix<sup>-</sup>に 2 遺伝子座である。残りの 1 遺伝子座は Nod<sup>-</sup>に近い low nodulation の表現型を持つものである。

# (1) 根粒非着生変異体 *Nod- sym70, sym71, sym72*

根粒非着生を与える3つの遺伝子座 *sym70, sym71, sym72* を同定した(図4a)。根粒が全く形成されないことの原因としては根粒菌への Nod 遺伝子の誘導物質の生合成を欠損したもの、あるいは共生菌の分泌する Nod factor の受容からその情報伝達のいずれかに破綻が生じたもの等が考えられる。そこでナリンゲニン処理で恒常的に Nod factor を分泌する共生細菌 *Mesorhizobium loti* JRL501 pMP2112 を作成し(図5)、上記3系統の根粒非着生変異体への感染を行ったが、根粒非着生の形質は全く回復されなかった。よってこれら3つの変異体は Nod factor の受容あるいはそ

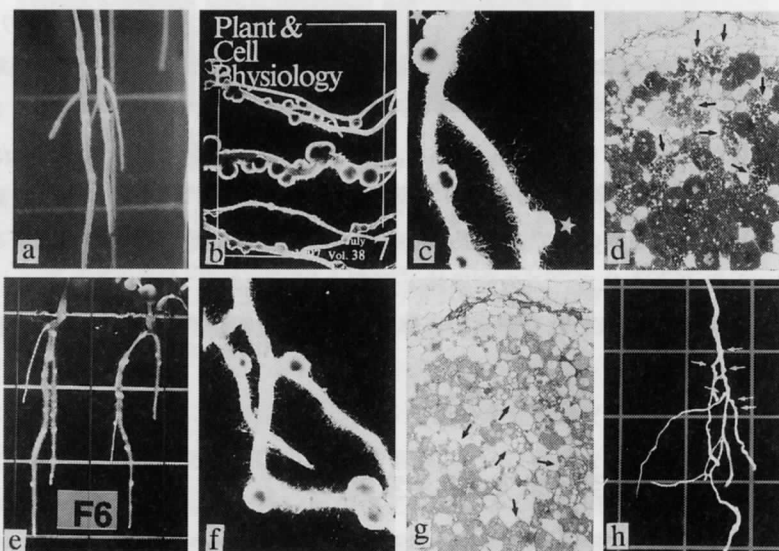


図4 有効根粒の発生過程における変異体

a, 根粒非着生変異体 *Nod- (sym71-1)*; b, 無効根粒を着生する *fen1* 変異体 (*sym76*) と根粒内の組織形成に異常を示す *alb1* 変異体 (*sym74-1*) (上段は *fen1* 変異体, 中央は野生型, 下段は *alb1* 変異体); c, GUS で標識した根粒菌を感染させた *fen1* 変異体 (星印は GUS で青く染色されない根粒); d, *fen1* 変異体の根粒内部構造 (矢印は顆粒化している感染細胞); e, 球形の白くて小さい根粒を着生する *sym75* 変異体; f, GUS で標識した根粒菌を感染させた *sym75*; g, *sym75* の根粒内部構造 (矢印で示しきれないほど多くの感染細胞で小さい液胞が蓄積している); h, *alb1* 変異体の strong allele (*sym74-2*)。Nod- に似ており根粒原基のみが誘導される (矢印)。

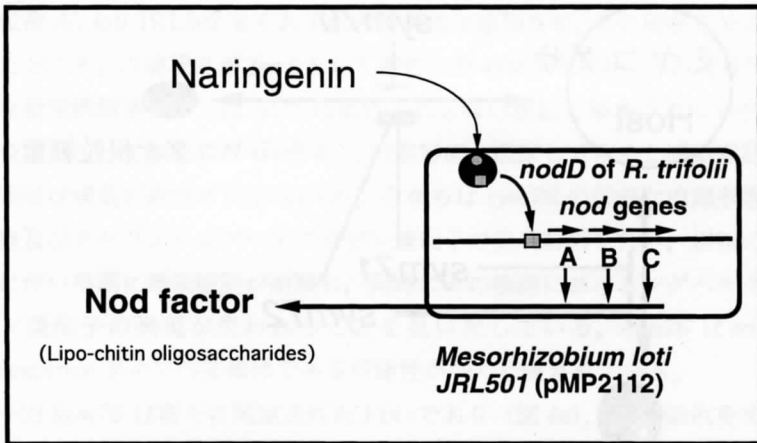


図5 ミヤコグサ菌 *M. loti* JRL501 に Nod factor を強制的に生産させる方法

れ以降の情報伝達系のところに変異が落ちており、根粒原基の誘導すらできない可能性が示唆された。このような3遺伝子座はさらに三重大の妹尾啓史博士らとの菌根共生系における共同実験によって、さらに3つの段階に分離された。*sym70* は根粒菌の感染さらに Nod factor の投与によっても根毛の変形すら観察されない変異体であるが、菌根菌を感染させた場合、宿主の根に正常に感染し樹枝状体を形成する。よって *sym70* は根粒との共生系の初期認識に特異的に働いている遺伝子であることが示唆される。それに対し、*sym71* と *sym72* は共に、菌根菌との共生的相互作用に異常をきたしてしまう。*sym71* においては2つのアレル *sym71-1*, *sym71-2* を見いだしているが、どちらもとも付着器を介して根の皮層組織への侵入には成功しているが、樹枝状態の形成が強く抑制されている。一方 *sym72* は皮層組織に侵入した時点で菌糸が異常に分岐し、さらに樹枝状態に関しては完全にその形成が阻害されている。*sym72* のようなミヤコグサの根粒共生系、並びに菌根共生系も強く阻害された変異体は世界的にも新規のものであり、注目される (図6)。

すべて劣性の1遺伝子支配の変異体である。

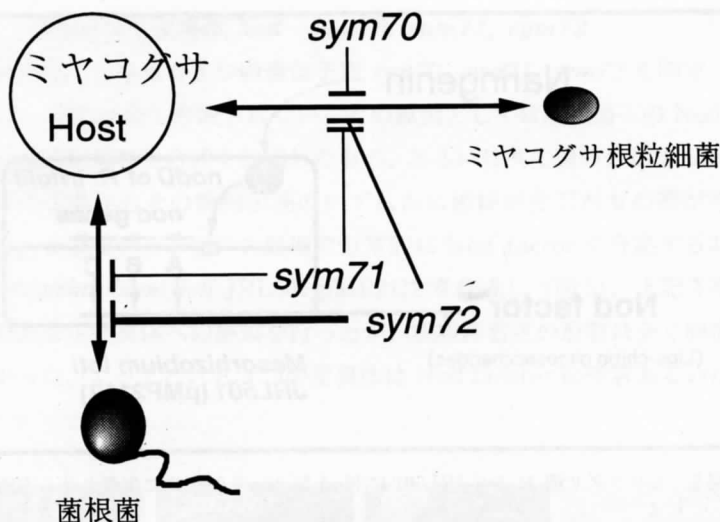


図6 Nod-の3遺伝子座 *sym70*, *sym71*, *sym72* の根粒及び菌根共生系における作用部位

## (2) 少ない根粒の着生数が認められる変異体 *sym73*

いわゆる low nodulation の変異体である。今回の分類では有効根粒の数における変異のカテゴリーに入れるべきものかもしれないが、根や根毛に顕著な変異のみられる *slp* や *ror1* よりむしろ表現型は典型的な Nod-に近い。Nod-の weak allele である可能性があるため *sym70*, *sym71*, *sym72* とアレリズムテストを行ったが、新しい遺伝子座であることが確認された。

劣性の1遺伝子支配の変異体である。

## (3) 無効根粒変異体 Fix-*sym75*, *fen1* (*sym76*)

ミヤコグサの根粒はダイズやインゲンのように有限根粒であるため、最終的な根粒の形状は球形である。球形根粒の内部形態は根粒菌の感染した感染細胞と感染しない非感染細胞の分化、それを取りまく根粒柔組織と外師包囲維管束の分化、根粒内皮の分化が伴っている。今回同定した2つの変異体はそのような基本構造の分化は完了しているが、感染細胞が早期に異常を示し、崩壊する変異体である。*gusA* 遺伝子でラベルしたミヤコグサ

根粒菌 *M. loti* JRL507 をそれぞれの変異体に感染させ、その局在をモニタしたところ、以前我々が *fen1* として報告した *sym76* (図 4b 上段) では<sup>8)</sup> 完全な窒素飢餓条件下では GUS に染色される青い根粒と染色されない白い根粒が混じって観察される (図 4c)。内部形態を観察してみると感染細胞にの顆粒状構造が観察された (図 4d)。今泉らは *sym76* の詳細な内部形態の観察及びミヤコグサレグヘモグロビン遺伝子の発現解析を行い、根粒の成熟に伴い早期に感染細胞が崩壊し、同時にその細胞におけるレグヘモグロビン遺伝子の発現が失われることを見いだしている。*sym76* は early senescence タイプの変異体である可能性が強く示唆されている。

一方 *sym75* は新たに同定された Fix- であり (図 4e), GUS 染色をするとすべての根粒がうすく青に染まっているものの、内部形態の観察からは感染細胞に小さな液胞が多数形成されているのが観察された (図 4f, g)。

ともに劣性の 1 遺伝子座支配の変異体である。

#### (4) 根粒の組織形成過程に異常をもつ変異体 *Hist-alb1* (*sym74-1*)

根粒形成の変異体の変異形質を並べてみると、Nod- のカテゴリーあるいは Fix- のカテゴリーに収まらない中間形のものが存在する。*alb1* (*sym74-1*) は以前根粒内での根粒の局在に異常の認められる Fix- として報告したが<sup>8)</sup> (図 4b 下段), その後の詳細な解析から *sym74* は根粒器官内の維管束の分化, すなわち根粒内で感染領域を取り囲むように発達する維管束の分化が阻害された変異体であることが判明した。さらに興味深いことに *alb1* 根粒においては *ENOD40* の発現も強く抑制されていることもわかった (Imaizumi-Anraku et al. in preparation)。最近 *sym74* の strong allele (*sym74-2*) が見いだされたが、それは外見上ほとんど Nod- に近く、感染後 4 週間で根粒の原基のみが誘導されるというタイプであった (図 4h)。

*sym74* は劣性の 1 遺伝子支配の変異体である。

## 6. メンデル遺伝を示さない pleiotropic な変異体 *sym79*

*sym79* は 2 度バッククロスされたが、一度目も二度目も F2 世代でのメンデル遺伝が確認されなかった変異体である。F2 での分離比は、野生型対

変異体がおおよそ 8:1 であった。形質は low nodulation であり、また根粒の分化過程に異常がありきれいな球形に発達しない Hist- の表現型を示す。また変異体は根粒形成のみならず、莢が小さいという pleiotropic な表現型を示す。Szczyglowski らはミヤコグサのミュータントではじめて F2 世代で異常な分離をするものを見いだしている。彼らが Class 4 として位置づけている変異体 *LjEMS45*, *LjEMS88*, *LjEMS217* は 10:1 程に分離しメンデル遺伝を示さない。しかし遺伝形質は安定であり Fix- の表現型を示す<sup>6)</sup>。

*sym79* は 3:1 の分離比を示さない劣性の変異体である。

## 7. 以上の結果を踏まえ

### — 一見えてこない根粒発生プログラムを制御する宿主遺伝子群の底辺 —

以上がミヤコグサで試みた saturation mutagenesis による根粒発生プログラムの細分化の途中経過である。一言でいうならば根粒共生系の saturation mutagenesis の試みは失敗した。確かに saturation mutagenesis を意識して変異体を単離したために、今までに記載のないユニークなものを単離することに成功したが、根粒共生系を制御する宿主の遺伝子座すべてを把握するには、かなり遠かった。筆者らの実験では、まだアレリズムテストを進行中の段階であるが、そのように判断するのは約 4 万の M2 種子を用いたスクリーニングから新規な表現型をもつものがようやく 1 系統単離されている段階だからである。ゼブラフィッシュの神経形成メカニズムを研究するフライブルグ大学の清木誠博士によるとすべての遺伝子座において少なくとも 3 つのアリールを確認した時点でほぼ飽和状態と判断するそうだが、新規の形質をもつもので同じように 3 アリールを確認するならば、その形質をもつ 3 系統の変異体は少なくとも単離されていなくてはならない。4 万個の M2 種子の中で 1 系統単離されてくる新規の変異形質に関しては、それを飽和するには少なくとも  $4万 \times 3$  で 12 万の M2 種子を調べる必要がある。また今までの経験からスクリーニングの規模を増やせば増やすほど新たな形質のものが単離されてきている状態なので 10 万のス

クリーニングで1系統という割合で単離されてくる変異体も今後いくつかでてくることが予想される。また仮に40万のスクリーニングでほぼ飽和状態に近づいたにしても、このままの頻度で共生変異体が単離されるとすると、そのスクリーニングにより数百の Nod-, Hist-, Fix- が単離されることになる。根粒共生系の遺伝子座を早急にマッピングしていかない限り、アレリズムテストの組み合わせの膨大のため、新しい遺伝子座を同定することすらできない状況が予想される。

Stougaard らは共生変異体を *sym* に統一することを強調している。筆者らは当初単離した共生変異体に関してその形質の解析から *alb1*, *fen1* と命名したが<sup>8)</sup>、現在それぞれに *sym74*, *sym76* と番号をつけている。ミヤコグサの変異体は、Stougaard らのオーフス大が *sym1-20*<sup>9)</sup>、Szczyglowski らのミシガン州立大が *sym21-40*<sup>6)</sup>、筆者らが *sym70-89*、不明(*sym41-67*)と *sym* 番号を分担し、まずそれぞれの手持ちの変異体で遺伝解析を行い、将来的にはお互いのラボの間でアレリズムテストを行い、アリアルが見つかった場合その *sym* 番号のうちの低い番号に整えていくとしている。筆者らは Stougaard の提案に従っているが、遺伝子座を同定していく場合、このような状況は初耳であり、これも共生の変異体が予想以上に多く単離されてくるために相互のラボ間でのアレリズムテストができにくいことに起因している。

飽和を現実のものとするには根粒形成全体を対象にするのではなく、1つの現象に絞り込む必要がある。この場合単離されてくる変異体の数が最も少くなるような形質を選ぶとよいと思われる。今回の結果からは、出現頻度の低いものとして、4万の M2 種子に3系統の割合で単離されてきた根粒を多く着生する変異体が注目される。すなわち根粒形成の負の制御因子の実体を扱うのであれば飽和は可能であると考えられる。また共生変異体の単離と平行して行った就眠運動の saturation mutagenesis も頻度は低いので可能であろう。

## 8. ミヤコグサにおける根粒発生プログラムの細分化

得られた多くの根粒の発生過程に異常をしめす変異体の中から代表的な

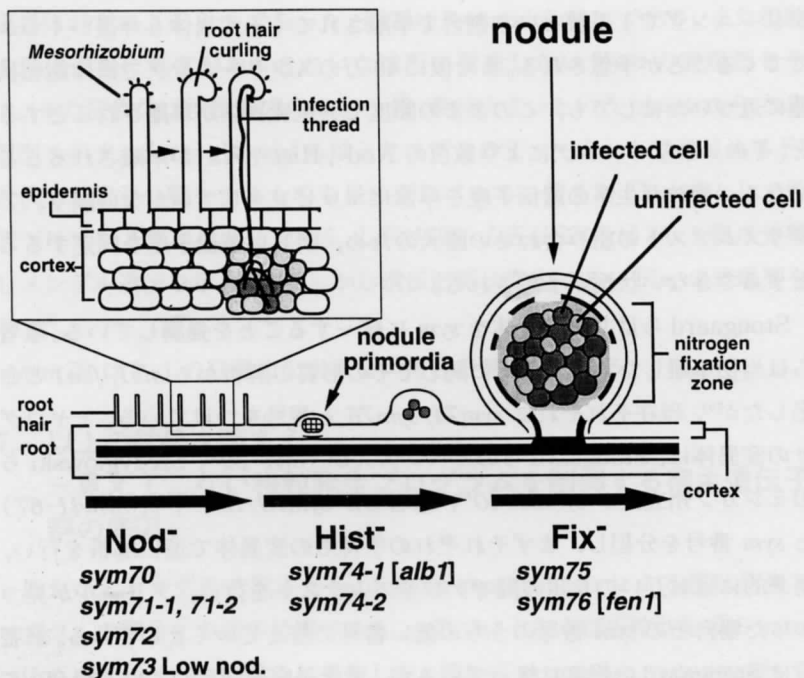


図7 根粒の発生段階を制御する3つのカテゴリーと *sym* 遺伝子の作用点

形質のものをピックアップした。さらに7遺伝子座により制御される変異形質の解析から、根粒発生プログラムを Nod<sup>-</sup>, Hist<sup>-</sup>, Fix<sup>-</sup> の3段階に細分化した (図7)。

Nod<sup>-</sup>は根粒原基の形成に関係する遺伝子の破綻、Hist<sup>-</sup>は根粒内の組織形成に関係する遺伝子の破綻、Fix<sup>-</sup>は根粒内部の組織化は終了し根粒細菌の細胞内への取り込みまでは正常に進行しているが共生窒素固定の機能発現における遺伝子の破綻によるものである。Nod<sup>-</sup>の3つの遺伝子座に関しては菌根菌との共生状態からさらに3段階に細分化され、Fix<sup>-</sup>については感染細胞の状態から2つの種類に分けられた。

## 9. 共生系における *SYM* 遺伝子の進化の予測

今回、根粒細菌と菌根菌との相互作用を観察することによって、根粒共



生系に特異的に働く遺伝子 *sym70*, さらに根粒共生系と菌根共生系の両者に働く遺伝子 *sym71*, *sym72* を同定した。菌根菌との共生系は今から少なくとも 4 億年前に陸上植物とともに進化してきたと言われる<sup>10)</sup>。菌根共生系の成立は, 明らかにマメ類がこの地球に誕生したとされる約 0.9-0.7 億年前よりもはるか以前である。*SYM71*, *SYM72* が菌根共生系のはじまりと共に維持されてきた遺伝子であるとするならば, マメ科植物の根粒共生系はそれを借用したことになる。その際, 菌根共生系に必要とされる遺伝子を根粒形成の引き金として働くように改変したことが考えられる。実際植物に広く存在する遺伝子が, マメ科植物では, マメに特徴的な形質を制御する遺伝子として新たに機能している例がある。その遺伝子は植物の花芽分裂組織のアイデンティティを決定する遺伝子 *FLORICAULA/LEAFY* (*FLO/LFY*) である。エンドウでは花芽が分化ができず複葉が単葉に変換する変異体 *unifoliata* (*uni*) が知られていたが, なんとその責任遺伝子は *FLO/LFY* であった<sup>11)</sup>。マメ科植物は *FLO/LFY* を花芽の形成のみならず, 進化の過程で複葉形成にも使っていたのである。

*SYM71*, *SYM72* とは対称的に *SYM70* は菌根共生系とは関係なくマメ科植物の根粒共生系の進化に特注されてきた遺伝子と解釈することも可能である。その場合その進化の生じた時期は, マメ目の祖先の誕生の約 0.9-

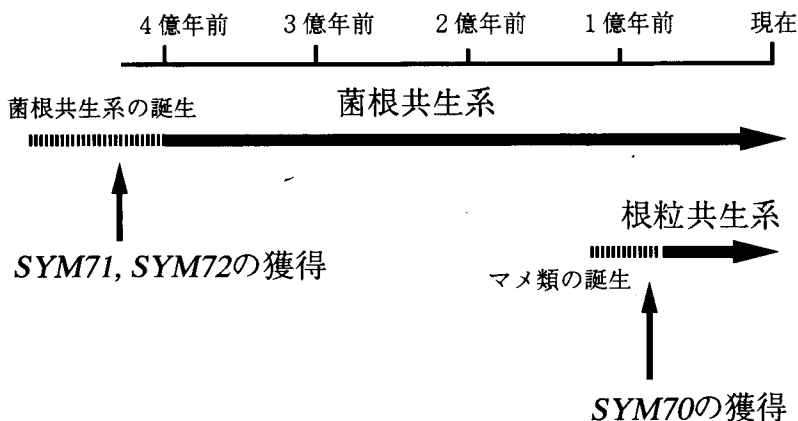


図 8 共生系における *SYM* 遺伝子の進化の予測

0.7 億年ほど前からと推測される (図 8)。

## 10. 共生ネットワークを形成する仮想の遺伝子 *SYMNET*

今回のワークショップではエンドファイトをはじめ多くの未知の植物と共生する微生物が話題であった。思うに *SYM71*, *SYM72* のような原核と真核生物の共生系に働く遺伝子はまだ研究されていない他の未知の微生物の共生にも働いているのではないだろうか。*SYM70* は根粒細菌との相互作用に特注の遺伝子と現時点で考えられるが、それとは対称的にあらゆる生物との共生系に広く働く宿主遺伝子があるのではなかろうか。1つの宿主遺伝子に変異を受けることによって、1つの種の生物だけでなく多くの共生する生物にも影響を与える。言い換えれば、その1つの遺伝子の獲得により多くの生物の共生系を成立させしめる宿主遺伝子が存在するのではないか。宿主 (Host) を中心に、たった一つで多様な生物との共生系を結ぶ遺伝子、それを模式的に書いてみるとあたかもそれはネットワークの構図に似ていた (図 9)。共生ネットワーク '*SYMNET*' (*symbiotic network*)。

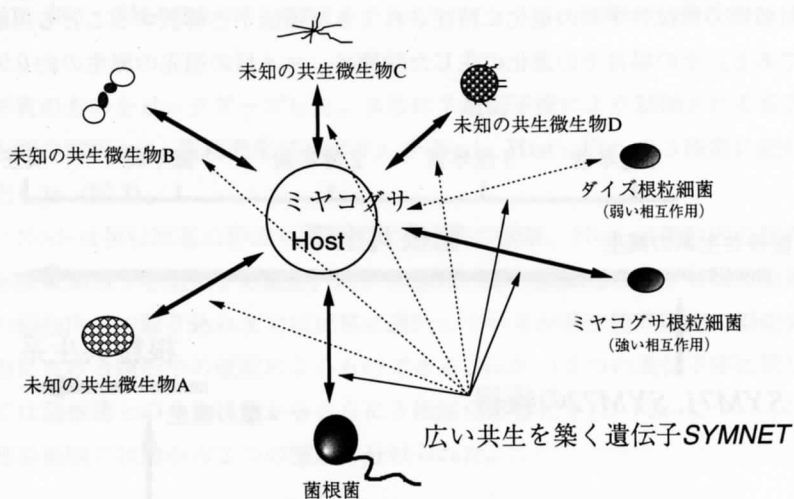


図 9 共生ネットワークを形成する仮想遺伝子 *SYMNET*

すでにミヤコグサの1遺伝子の作用域を確認しているものについては、'*SYMNET*' から細い実線で表した。

それを形成する宿主遺伝子の存在は、ミヤコグサに共生する未知の生物を同定し、それらと根粒・菌根共生変異体である *sym71*, *sym72* の相互作用を解析していくことによって明らかになっていくものと思われる。

## 11. メンデル遺伝をしない変異体について

nodulin 遺伝子の発現は根粒において顕著であるものの、必ずしも根粒に限定された発現パターンを示さない。花や、茎、根で発現している nodulin 遺伝子もいくつか報告されている。仮にその nodulin 遺伝子が、発現している根粒並びにそれ以外の器官の形成や成長をコントロールしているとすると、その遺伝子に変異が導入された場合、根粒形成のみならず他の器官あるいは組織にも影響がでると考えられる。つまり pleiotropic な発現様式をする nodulin 遺伝子に変異が導入されると、pleiotropic な変異体が単離される可能性がある。その様な観点から今回単離した変異体の中でも pleiotropic な表現型をもち、F2 で 3:1 に分離しない変異体に興味を持たれる。Szczyglowski らがはじめてミヤコグサで歪んだ分離比を示す Fix- を報告しており、変異が生殖過程にも及んでいる可能性を議論している<sup>6)</sup>。現在の段階では Szczyglowski らも筆者らも生殖のどの過程に異常が生じているのか不明であるが、その詳細な解析が待たれる。遺伝学的に pleiotropic な共生変異体を解析していくことは、共生遺伝子の機能を類推する上でヒントを与えるからである。*sym79* の詳細な解析から受精から英の形成過程における作用点を明らかにすることは、また、根粒共生系がその確立期においてどのような遺伝子を借用してしてきたかを探る上でも興味深いテーマとなるだろう。以上を分子レベルで語るのであれば、ここにマメの分子遺伝学的解析が必要とされるのは言うまでもない。

## 最 後 に

今回のミヤコグサ変異体の大規模スクリーニングは赤尾勝一郎博士の好意により農水省農業生物資源研究所の屋外型温室で行われた。われわれは当初 8,000 の EMS 処理をした M1 種子を育てたが、アブラ虫やアザミウマが大発生したために半数以上の M1 植物から M2 種子を回収することが

できなかった。必ずしもよい seed family が得られたわけではなかったもので、今回紹介した変異体の単離頻度はあくまでも目安として頂ければ幸いである。ミヤコグサの場合、虫が大量発生するとその後どんなに殺虫剤を散布しても、効果が得られず、研究もストップしてしまう。今後ミヤコグサの遺伝解析を計画している研究者には、虫の発生をくい止めるよう細心の注意を呼びかけたい。それは虫のためでもある。

## 参考文献

- 1) 岡田益吉 (1996) 科学 66: 9-12.
- 2) Driever, W. & Nüsslein-Volhard, C. (1988) Cell 54: 83-93. 95-104.
- 3) Zebrafish Issue (1996) Development 123: all pages.
- 4) Handberg, K. & Stougaard, J. (1992) Plant J. 2: 487-496.
- 5) Oyama, T., Shimura, Y. & Okada, K. (1997) Genes & Dev. 11: 2983-2995.
- 6) Szczygłowski, K., Shaw, R.S., Wopereis, J., Copeland, S., Hamburger, D., Kasiborski, B., Dazzo, F.B. & de Bruijn, F.J. (1998) Mol. Plant Microbe Interac. 11: 687-697.
- 7) Kneen, B.E., Weeden, N.F. & LaRue, T.A. (1994) J. Heredity 130: 129-133.
- 8) Imaizumi-Anraku, H., Kawaguchi, M., Koiwa, H., Akao, S. & Syōno, K. (1997) Plant Cell Physiol. 38: 871-881.
- 9) Schauser, L., Handberg, K., Sandal, N., Stiller, J., Thykjær, T., Pajuelo, E., Nielsen, A. & Stougaard, J. (1998) Mol. Gen. Genet. 259: 414-423.
- 10) Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H. & Kerp, H. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11841-11843.
- 11) Hofer, J., Turner, L., Hellens, R., Ambrose, M., Matthews, P., Michael, A. & Ellis, N. (1997) Current Biology 7: 581-587.

# 植物・微生物間相互作用の解明に 向けた根粒菌の分子生物学

—— 根粒菌のライフ・ヒストリーに  
関連して ——

三 井 久 幸

---

## 根粒菌の研究で明らかになってきたこと

マメ科植物根粒での根粒菌による共生窒素固定は、注目すべき生物機能として今や膨大な研究の蓄積がある。植物にとって、窒素は土壤中に不足しがちな必須元素であることから、地球上における多種多様なマメ科植物の繁栄は、この窒素固定能が支えているとあって過言ではあるまい。根粒菌とマメ科植物との共生系は、共生相手の識別、共生特異的な形態形成、窒素固定活性の制御、等々において進化の妙とも言うべききわめて精緻な仕組みを有しており、多くの研究者がその研究に取り組んできた。

一口に根粒菌と言っても、*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* 等の属を含む（これらの中には、互いに進化系統的にかなり離れているものがある）多様な土壌細菌の集団である。多くの場合、一つの根粒菌が宿主とするマメ科植物の種類は限定されている。

窒素固定を触媒する根粒菌の酵素 Nitrogenase は酸素に触れることによって失活するため、窒素固定は酸素感受性の過程である。一方、窒素固定には多量のエネルギー（ATP）が必要なため、高い（有気）呼吸活性が同時に要求される。また、そのような ATP を多量に消費するコストの高い反応は、必要な時以外には抑えなければならない、ということにもなる。

この十数年間で、これらの仕組みのいくつかは明らかになってきた。以下例示（総説 1-5）。

根粒菌は Nod factor (実体はリポキチン化合物) を合成し、その作用によって、宿主植物特異的に共生反応 (根毛の変形・感染糸の形成等により根粒菌の植物体への感染・侵入が可能となる。根皮層に細胞分裂が誘導され、根粒原基が形成される。等々) が引き起こされる。異なる根粒菌種・株の Nod factor はそれぞれ特異的に異なる構造を有しており、それは、キチン糖鎖長、結合している不飽和脂肪酸の種類、lipochitooligosaccharide 基本骨格に付加される特異的な修飾、等に起因する。その構造の特異性が宿主植物特異的に共生反応を引き起こす。また、Nod factor の生合成遺伝子群 *nod* の発現は、宿主植物根から分泌される特定のフラボノイドの存在下で、転写調節因子 NodD の関与する機構によって誘導される。このように、植物の生産するフラボノイド、根粒菌の生産する Nod factor それぞれの特異的な構造が、共生相手選択の特異性の主要な機構である。

根粒菌の窒素固定関連酵素の発現は、周囲の酸素濃度の低下によって誘導される。酸素濃度の感知とその情報伝達は、二成分制御系 FixL/FixJ が担っている。FixL はヘムを含む膜蛋白質であり、酸素のセンサーとして働く。FixJ は転写調節因子であり、リン酸化によって活性化すると *nifA*, *fixK* の転写を促進する。その結果、転写調節因子 NifA, FixK の制御下にある窒素固定関連遺伝子群 (*nif*, *fix*) の発現が誘導される。

## 根粒菌の共生特異的な分化機構は解明されていない

筆者が研究に用いている根粒菌種は、*Sinorhizobium meliloti* (アルファルファ根粒菌。旧名 *Rhizobium meliloti*) である。これは、多種多様な根粒菌のうちで研究の蓄積の特に多い種の一つであり、以下本章では *S. meliloti* を中心に述べることになる。

根粒菌の共生特異的な性質のうち、Nod factor の生合成経路や、*nod*, *nif*, *fix* 等の遺伝子の発現制御の分子機構については、詳細な情報が既に得られている。しかし、根粒菌が宿主細胞内に送り込まれた後に、細胞内共生体として確立する過程の分子機構はほとんど不明である。

根粒菌は、根粒細胞のエンドサイトーシスのような仕組みによって、感染糸から植物細胞内に取り込まれる。取り込まれた根粒菌はペリバクテロ

イド膜 (PBM) という植物原形質膜由来の膜からなる小胞 (その単位を「ペリバクテロイド・ユニット (PBU)」または「シンビオソーム」と呼ぶことがある) に包まれている。植物細胞内に送り込まれた根粒菌はバクテロイドと呼ばれる。バクテロイドは PBM の内側で増殖を続け、その結果宿主細胞は PBM・根粒菌で満たされる。その後、バクテロイドは細胞分裂を停止し、特徴的に肥大化した細胞へと変化し窒素固定を行う。更にこの分化過程が進むと、老化により窒素固定能を失い死に至る。*S. meliloti* のバクテロイドのこのような分化過程は、電顕観察による細胞形態の違いから 5 段階 (Type 1, 2, 3, 4, 5) に分類されている (6)。

## 共生特異的な細胞分化過程における根粒菌と宿主植物との密接な関係

一つの PBM に包まれているバクテロイドの数は 1 個ないし 8 個以内であり、それ以上に増えることは通常見られない。これは、バクテロイドが宿主細胞に取り込まれた直後の増殖の過程、およびその後の肥大生長の過程で、宿主細胞による PBM の生合成も同時に進み、バクテロイドの細胞分裂と協調して PBU の分裂が起こることを示す。

アルファルファの根粒は、分裂組織が根粒先端部に維持され続ける、すなわち、生存中根粒の (先端方向への) 生長が持続する「indeterminate nodule」である。そのため一つの根粒には、未分化の若い組織と成熟更に老化した古い組織の両方が縦方向に並んで存在することになる。成熟根粒内部は、根粒先端側の若い組織から基部側の古い組織へ向かって、構成細胞の形態や細胞含有物質等により、Zone I (Meristem), Zone II (Invasion zone+Prefixing zone), Interzone II-III, Zone III (Nitrogen-fixing zone+Inefficient zone), Zone IV (Senescent zone) と区分される (総説 7)。これにより宿主細胞の分化過程が一目瞭然である。

前述したバクテロイドの各分化段階のものは、宿主細胞の特定の組織にのみ特異的に存在する。例えば、Type 3 バクテロイドは Interzone II-III にのみ存在し、逆に、それ以外のバクテロイドはその組織に見られない。Type 4 バクテロイドは、窒素固定活性を有する組織である Zone III の外半分

(Nitrogen-fixing zone) にのみ存在する。また、根粒菌の種々の Fix<sup>-</sup> 変異株 (*fixL*:Tn5, *fixJ*:Tn5, *fixG*:Tn5 等) は、宿主細胞内で、Type 4 バクテロイドに変化する前に細胞が変質して死に至る。このような変異株の感染によって形成誘導された根粒の内部には、Zone III が形成されずに Interzone II-III の次は Zone IV になっている (6)。

以上は、細胞間の相互作用というレベルで、感染した根粒菌が宿主植物の共生特異的な形態形成に影響を与えている例である。すなわち、根粒菌細胞の共生分化過程は、根粒菌・マメ科植物間の細胞内共生系全体の成立に重要な役割を担っていることは確かであり、この考えが筆者の根粒菌研究の出発点である。

## 根粒菌の生活史

根粒菌は共生細菌であると同時に土壌細菌であるという二面性を有する。このことが根粒菌の生活史を複雑にしている。

宿主の根粒細胞内で分化過程を経、成熟したバクテロイドは窒素固定を行った後に老化し死に至る。クローバー根粒菌 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*) の成熟バクテロイドは栄養増殖を再開させることができないと報告されている (一方、単生状態の細胞と成熟バクテロイドとの形態変化の小さい大豆根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* では、成熟バクテロイドからの培養が可能である) (8)。一方、分化段階の進んでいない(未成熟)バクテロイドは、宿主の老化・枯死による根粒崩壊により土壌中に入り、単生の土壌細菌としての生活に戻ると推測される。

根粒菌を液体培養し、増殖が飽和した後に長期間放置すると、細胞が増殖期の桿菌形態より小さくなった球菌状の形態に変化しているのが観察される (9)。ここで生菌数は減少しておらず、小さな形態の細胞は栄養の枯渇等に対応して生命を維持しているいわゆる「定常期」の状態にあると考えられる。細菌が増殖の定常期に耐久性を獲得する性質については、大腸菌を中心に研究が進んでいる(総説 10)。実際 *S. meliloti* で、定常期において生存を維持する能力の減少した変異株が取得されている (11)。

土壌とは、多くの場合根粒菌にとって増殖が可能とならないようなスト



レス環境（主に栄養面において）である。培養実験の結果から見て、土壌細菌としての根粒菌の生活環には、増殖を停止した耐久状態と環境の変化によって栄養増殖が可能となった状態とが含まれていると考えられる。

## 根粒菌の分子生物学的解析から共生を理解する

筆者は、根粒菌の共生分化過程の解明には、根粒菌の細菌としての基本的な性質を理解し、それを基盤に研究を進める必要があると考えている。*S. meliloti* のゲノムは3つのレプリコンから構成されており、それぞれ通常 chromosome（サイズ 3.5 Mb）、pSym-a（1.4 Mb）、pSym-b（1.7 Mb）と呼ばれている(12)。後者二つは Sym プラスミドと呼ばれ、*nod*, *nif*, *fix*, *exo* 等といったような共生特異的な機能を担う遺伝子を含んでいるが、根粒菌の培地上での増殖には必須ではない。筆者の考えは、いわば、chromosome にコードされているような細菌としての生命活動に必要な遺伝情報に注目する、ということである。そういった見地に立った理由を書き連ねることはここでは避ける。今後の報告の中で触れる。

現在は、細胞分裂の調節、グローバルな遺伝子発現の調節という二つの問題に取り組んでいる。その成果の一つとして、RNA ポリメラーゼ・シグマ因子について、*S. meliloti* には大腸菌の *rpoH*（ヒートショックシグマ因子  $\sigma^{32}$  の構造遺伝子）の相同遺伝子が二つあり（*sigB*, *sigH*）、それらが一次構造及び発現パターンについて互いに顕著に異なっていることを本ワークショップで報告した。具体的なデータについてはこの紙面では示さず、別の機会に紹介したい。

## 参考文献

- 1 Fisher, R.F. & Long, S.R. *Nature* **357**, 655-660 (1992).
- 2 Van Rhijn, P. & Vanderleyden, J. *Microbiol. Rev.* **59**, 124-142 (1995).
- 3 Denarie, J., Debelle, F., Prome, J.-C. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 503-535 (1996).
- 4 Long, S.R. *Plant Cell* **8**, 1885-1898 (1996).
- 5 Fischer, H.-M. *Microbiol. Rev.* **58**, 352-386 (1994).
- 6 Vasse, J., De Billy, F., Camut, S., Truchet, G. *J. Bacteriol.* **172**, 4295-4306

- (1990).
- 7 Hirsch, A.M. *New Phytol.* **122**, 211-237 (1992).
  - 8 Zhou, J.C., Tchan, Y.T., Vincent, J.M. *Planta* **163**, 473-482 (1985).
  - 9 Mitsui, H. Unpublished data.
  - 10 三井久幸 新・土の微生物 (3) p. 83-119 土壤微生物研究会編 博友社 (1998).
  - 11 Uhde, C., Schmidt, R., Jording, D., Selbitschka, W., Puhler, A. *J. Bacteriol.* **179**, 6432-6440 (1997).
  - 12 Sobral, B.W.S., Honeycutt, R.J., Atherly, A.G., McClelland, M. *J. Bacteriol.* **173**, 5173-5180 (1991).

# 共生窒素固定系の硝酸阻害機構

金山 喜則・岡村 好倫

---

## はじめに

光、水あるいは温度といった基本的な環境条件が満たされている場合、次に植物の生育を制限するのは窒素栄養であるといわれている。作物生産においてもあるレベルまでは窒素施肥量と生産量には正の相関が認められる。適切な土壌診断と有機質肥料および化学肥料のバランスのとれた供給を行えば、窒素施肥の環境への影響は小さいが、収量増加の観点だけで過剰な窒素施肥を行うと、環境への負荷が問題となってくる。畑地などの好氣的土壌において、植物に吸収される窒素形態は主に硝酸態窒素であるが、過剰に存在すると溶脱し地下水や湖沼を汚染する。以前から欧米では硝酸態窒素の潜在的な危険性が指摘されており、皮膚の血行が滞るチアノーゼなどの健康被害が乳幼児に出ている。日本ではまだ健康被害などは報告されていないが、最近、環境基本法に基づく水質の環境基準健康項目に硝酸態窒素を追加することが環境庁長官に答申されている。

合成時に化石燃料の消費を伴い、環境への負荷が懸念される化学肥料に比べて、マメ科作物と根粒菌との共生による窒素固定は、クリーンでかつ安価な生物肥料といえる。特に根粒という共生組織内で物質の授受を行うため、ロスのない極めて効率の良い窒素供給源となり、結果として環境への負荷もない。このほか主に栄養成長を促進する硝酸態窒素に対し、固定窒素は子実へ優先的に分配されるという利点もある。

以上のように理想的な窒素供給源としての窒素固定であるが、生産現場においては窒素施肥との共用によって高い収量が得られる。すなわち根粒が十分発達するまでや、根粒が老化し始めてからの窒素固定能の低い時期を中心として、施肥窒素が必要である。しかし古くから知られているように、窒素固定は化合態窒素により抑制されるので、多収量を得るため化合態窒素を多量に与えても、それほど効果は上がらず、むしろ窒素固定が低下し茎葉の過繁茂による収量低下も起こりうる。このためマメ科植物の栽培においては窒素施肥による窒素固定の阻害を常に意識せねばならず、今後非マメ科作物への窒素固定能の付与が成功した際も、窒素施肥により窒素固定が低下し両窒素を有効に利用できない危険性がある。従って窒素固定を高いレベルで持続させつつ、十分な成長を維持するための化合態窒素を与えていくことを目的とした、窒素固定の硝酸態窒素による抑制現象の解明は重要である。

## 硝酸阻害機構の分類

硝酸態窒素による窒素固定の阻害現象には以下のような段階がある。

### ① 根粒着生の阻害

硝酸態窒素の供給によりエチレン生成が増加し、それによる根粒着生数の減少というモデルがアルファルフアで提唱されている<sup>1)</sup>。しかし、エチレンを介した根粒着生の制御については、必ずしもすべてのマメ科植物に当てはまるとは限らないようである。また最近の報告では、根粒形成の初期段階である根毛のカーリング、皮層細胞の分裂および感染糸の形成における阻害がみられるが、nod factor のシグナル受容と初期の情報伝達は阻害されていないことが明らかとなっている<sup>2)</sup>。

### ② 窒素固定活性の阻害 (Short term)

10 mM 程度の比較的高濃度の硝酸態窒素の添加により、24 時間あるいは 2～3 日程度の短期間に起こるニトロゲナーゼ活性の速やかな低下。

### ③ 窒素固定活性の阻害 (Long term)

5 mM 以下の低濃度の硝酸態窒素が長期間与えられた場合に起こるニトロゲナーゼ活性の抑制。あるいは②の Short term の初期の低下に引き続

き起こる阻害を指す場合もある。②との違いは必ずしも明確ではないが、ニトロゲナーゼ活性の抑制現象の原因は単一ではないという見方が一般的。

#### ④ 老化

Long term 阻害に引き続き、硝酸態窒素の存在下で根粒が老化し、不可逆的に不活性化する現象。まだ詳細には検討されていないが、活性酸素の関与が示唆されている<sup>3)</sup>。通常の加齢に伴う根粒の老化と同一のメカニズムによるかなど、今後の研究が期待される。

共生窒素固定の硝酸態窒素による阻害現象は非常に古くから知られており、その農学的意義や植物生理学的興味から、数多くの研究者の関心を誘ってきた。おそらく共生窒素固定の研究に携わったことのある者は、一度は自分の実験系のなかで窒素化合物の影響に興味を持ったり、実際にその影響を調べた経験があると思う。しかしここで整理したように、阻害現象の段階だけでも幾つかに分類され、それぞれの阻害機構も単純ではない。植物の生存にとっては光合成産物の多くを削って根粒菌を養い、多量のATPをニトロゲナーゼ反応に消費するよりは、硝酸還元酵素と亜硝酸還元酵素という2つの酵素反応系でアンモニアを合成する方がエネルギー効率的に圧倒的に有利であろう。従って、窒素固定の硝酸阻害は植物にとってはより有利な窒素源への速やかな転換を行うための適応現象とみることもできる。ここでは窒素固定活性の阻害について、その中でも主に②の活性低下の引き金となる機構に焦点を当てて研究の流れと今後の展開について論議する。

### 旧来の阻害機構

硝酸態窒素による根粒ニトロゲナーゼの活性阻害機構に関する説は、かつては次の二つに分類することができた。一つは吸収された硝酸態窒素の同化と窒素固定との間の炭水化物に対する競合を原因とする説、もう一つは硝酸イオンの代謝産物の影響による説とする説である。前者については、窒素施肥により炭素の根粒への分配が低下したことが根拠としてあげられており、地上部での硝酸同化に光合成産物が奪われたとする説である。後者

については、当初、窒素固定に影響を及ぼす硝酸代謝産物としては亜硝酸イオンが有力視されていた。その根拠としては、いずれも *in vitro* での実験により、亜硝酸イオンが単離バクテロイドのアセチレン還元能を阻害すること<sup>4)</sup>や、ニトロゲナーゼの MoFe タンパク質に結合し活性阻害を起こすこと<sup>5)</sup>などがあげられた。

これらの説は 1980 年代までの一般的な考え方であるが、少なくとも、活性低下の第一要因としてあげるには次項であげるような決定的な問題点があった。そしてその後の研究は、これら旧来の説を否定するところから新たな展開を見せた。

## 機構解明へのヒント

前項の光合成産物競合説における問題点は、根粒の活性低下に可溶性糖含量の低下が対応しない例が多く提出されていることである。むしろ根粒で消費されるべく転流されたショ糖は硝酸添加により若干増加する<sup>6,7)</sup>場合もあり、根粒への炭素分配の減少は、窒素固定活性阻害に伴う根粒のシンク能低下の結果ではないかと考えられる。またダイズへの窒素の深層施肥が、地表近くに着生した根粒の窒素固定を阻害しないこともわかっており<sup>8)</sup>、地上部での硝酸同化との炭素の競合という単純な機構では硝酸阻害を説明できないことは明らかである。

次に注目すべき知見は、その後の研究に大きな示唆を与えるものであった。Schuller ら<sup>9)</sup>は窒素固定活性の低下した根粒から単離したバクテロイドのアセチレン還元能を測定し、硝酸阻害の初期にはバクテロイドやニトロゲナーゼ自体は影響を受けていないことを証明した。硝酸阻害時の根粒において、ニトロゲナーゼタンパク質の低下がみられなかったというデータも彼らの知見を支持している<sup>10)</sup>。これらの知見により、バクテロイドやニトロゲナーゼへの直接的な阻害作用ではなく、バクテロイドを取り巻く根粒内の環境、すなわちニトロゲナーゼ活性を維持するのに必要な植物側の要因の変化に焦点が当てられるようになった。

バクテロイドが存在する根粒の感染領域における特徴の一つは低酸素分圧である。これはニトロゲナーゼが酸素により不活性化されることと関連

しているが、ニトロゲナーゼ反応自体には好気呼吸に由来する多量の ATP が必要であるという矛盾を抱えている。このため根粒の皮層組織には酸素の透過を制御する酸素拡散バリアーが存在する一方、バクテロイド周辺では高い酸素親和性を持つレグヘモグロビンが酸素供給を促進している。硝酸阻害を受けた根粒において現在確実に言えることは、Layzell ら<sup>11)</sup> 他多数のグループにより報告されているように、バクテロイドへの酸素透過が抑制されている点であろう。これらの報告の多くは、皮層における可変的酸素拡散バリアーの変化による酸素拡散抵抗性の上昇を念頭に置いたものであるが、硝酸態窒素がどのようにバリアーを制御するのかについては全くわかっていない。一方レグヘモグロビンに関しては、その含量自体は少なくとも硝酸阻害初期には低下しないが、硝酸還元由来の一酸化窒素とレグヘモグロビンが結合したニトロシルレグヘモグロビン (LbNO) が形成されることによる、バクテロイドへの酸素供給低下を原因とする説がある<sup>12,13)</sup>。しかしこの説に関しても、*in situ* での証明がないことや、集積する LbNO がバクテロイドの呼吸に影響するほどの量なのかなどの疑問が出されている<sup>14)</sup>。

## 最近のユニークな知見

### ① 植物由来の硝酸還元酵素の関与

旧来の阻害機構のうち亜硝酸イオンの直接的なバクテロイドへの影響については、バクテロイドの硝酸還元酵素が関与していると考えられ、Streeter<sup>15)</sup> 他いくつかのグループで検討された経緯がある。その結果は、硝酸還元酵素欠損根粒菌により形成された根粒に硝酸態窒素を与えた場合でも、正常な根粒菌により形成された根粒と同様に窒素固定能が低下するというもので、バクテロイドの硝酸還元酵素の関与は否定されている。一方、根粒サイトゾルにも植物由来の硝酸還元酵素が存在することが知られている。葉や根における主要な硝酸還元酵素は基質誘導型であるのに対して、根粒サイトゾルの硝酸還元酵素は硝酸無添加の条件下でもかなりの活性を示し、しかも硝酸添加による活性の上昇が小さいなどの特徴を備えている(表 1)。ダイズには非誘導型および誘導型の硝酸還元酵素が知られており、そ

表1 ダイズ硝酸還元酵素活性に及ぼす硝酸態窒素の影響。ダイズは窒素を含まない水耕液で栽培し、開花期に 10 mM の硝酸態窒素を与え 24 時間後に活性を測定した。根粒サイトゾルでは硝酸無添加 (Control) でも高い活性がみられる

Tissue	Activity ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW h}^{-1}$ )	
	control	Nitrate
Leaf	$0.17 \pm 0.05$	$3.6 \pm 0.5$
Root	0	$0.71 \pm 0.04$
Nodule	$1.7 \pm 0.1$	$2.2 \pm 0.1$

れらとの比較を行うためダイズ根粒サイトゾルから硝酸還元酵素が精製された<sup>16)</sup>。その結果、根粒サイトゾルの硝酸還元酵素は誘導型とよく似ており、その硝酸無添加条件下での発現機構に興味が持たれている。

すでに述べたように、地上部での硝酸還元と根粒との炭水化物競合説については否定されている。しかし硝酸イオン自体がシグナルとなる場合以外は、硝酸還元以降の代謝が必要であり、根粒サイトゾルなどでの硝酸還元が硝酸阻害機構における不可欠なステップである可能性がある。このような観点から硝酸還元酵素欠損ミュータントを用いた研究はユニークであり、実際ミュータントにおいて硝酸阻害が軽減されたため、植物由来の硝酸還元酵素の阻害機構への関与が強く示唆されている<sup>17,18)</sup>。

## ② スクロース合成酵素の関与

Gordon ら<sup>19)</sup> はダイズを用いて、乾燥や硝酸あるいは高塩濃度処理などの各種ストレス処理における、根粒スクロース合成酵素の発現および活性と窒素固定能の低下との相関を報告している。この報告によると、他の窒素固定関連タンパク質であるグルタミン合成酵素やレグヘモグロビンのレベルはスクロース合成酵素のように変動しなかったようである。スクロース合成酵素は根粒へ転流してきたスクロースを分解するキー酵素であり、レグヘモグロビンやグルタミン合成酵素と同様にノジュリンである。その中でスクロース合成酵素のみが速やかなストレス応答性を見せた点は非常に興味深い (図1)。

様々なストレス処理下で、スクロース合成酵素活性はニトロゲナーゼ活



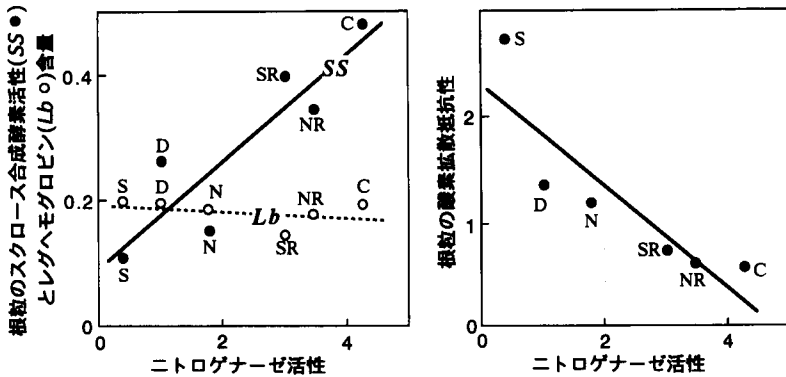


図1 ニトロゲナーゼ活性と根粒のスクロース合成酵素活性・レグヘモグロビン含量および酸素拡散抵抗性との関係。Sは高塩濃度、Dは乾燥、Nは硝酸、SRは芽除去、NRは50%根粒除去の各処理を、Cは対照区を表す。ニトロゲナーゼ活性とスクロース合成酵素活性とは正の相関を、酸素拡散抵抗性とは負の相関を示しているのがわかる。Gordonら<sup>19)</sup>からのデータをグラフにまとめた。

性と正の相関を示すのに対して、酸素拡散抵抗性は負の相関を示した（図1）。現在のところ、これら二つの要因の阻害機構における関係は不明である。想像にすぎないが、スクロース合成酵素活性の低下が根粒皮層細胞の水ポテンシャルに影響を与えたり、バクテロイドの呼吸低下に伴う酸素分圧の上昇を招くなどの可能性が考えられる。

## おわりに

根粒窒素固定が窒素施肥によって抑制されることは1900年代初頭にはすでに報告されており、現在まで、すでに述べたような農学的意義や植物生理学的興味から多くの研究者により吟味されてきたが、未だ混迷の度合いが深い。現在、根粒の酸素透過の低下が原因であるところまでは多くの研究者の信ずるところとなってきたが、その後画期的な仮説は登場していない。我々は最近の成果から、根粒サイトゾルの硝酸還元酵素とスクロース合成酵素に注目するとともに、研究材料を分子遺伝学に有利なミヤコグサへ変え、両遺伝子の形質転換による発現調節により硝酸阻害機構の解明に貢献しようと考えている。

## 参考文献

- 1) Caba, J.M., Recalde, L. and Ligerio, F. (1998) *Plant Cell Environ.* 21 : 87-93
- 2) Heidstra, R., Nilsen, G., Martinez Abarca, F., Van Kammen, A. and Bisseling, T. (1997) *Mol. Plant-Microbe Inter.* 10 : 215-220
- 3) Escuredo, P.R., Minchin, F.R., Gogorcena, Y., Iturbe Ormaetxe, I., Klucas, R.V. and Becana, M. (1996) *Plant Physiol.* 10 : 1187-1195
- 4) Rigaud, J., Bergersen, F.J., Turner, G.L. and Daniel, R.M. (1973) *J. Gen. Microbiol.* 77 : 137-144
- 5) Trinchant, J.C. and Rigaud, J. (1980) *Arch. Microbiol.* 124 : 49-54
- 6) Streeter, J.G. (1981) *Plant Physiol.* 68 : 840-844
- 7) Wasfi, M. and Prioul, J.L. (1986) *Physiol. Plant.* 66 : 481-490
- 8) Takahashi, Y., Chinushi, T., Nakano, T. and Ohyama, T. (1992) *Soil Sci. Plant Nutr.* 38 : 699-708.
- 9) Schuller, K.A., Day, D.A., Gibson, A.H. and Gresshoff, P.M. (1986) *Plant Physiol.* 80 : 646-650
- 10) Arrese-Igor, C., Minchin, F.R., Gordon, A.J. and Nath, A.K. (1997) *J. Exp. Bot.* 48 : 905-913
- 11) Layzell, D.B., Hunt, S. and Palmer, G.R. (1990) *Plant Physiol.* 92 : 1101-1107
- 12) Kanayama, Y. and Yamamoto, Y. (1990) *Plant Cell Physiol.* 31 : 207-214
- 13) Kanayama, Y. and Yamamoto, Y. (1991) *Plant Cell Physiol.* 32 : 19-24
- 14) Arrese-Igor, C., Gordon, A.J., Minchin, F.R. and Denison, R.F. (1998) *J. Exp. Bot.* 49 : 41-48
- 15) Streeter, J.G. (1985) *Plant Physiol.* 77 : 325-328
- 16) Kanayama, Y., Kimura, K., Nakamura, Y. and Ike, T. (1999) *Physiol Plant.* (in press)
- 17) Kaiser, B.N., Layzell, D.B. and Shelp, B.J. (1997) *Physiol Plant.* 101 : 45-50
- 18) Walsh, K.B. and Carroll, B.J. (1992) *Physiol Plant.* 84 : 283-291
- 19) Gordon, A.J., Minchin, F.R., Skot, L. and James, C.L. (1997) *Plant Physiol.* 114 : 937-946

# 根粒菌の生産するリゾビトキシンの共生における役割

安田 剛・遊橋 健一・市川 徳一  
貫井 憲之・南沢 究

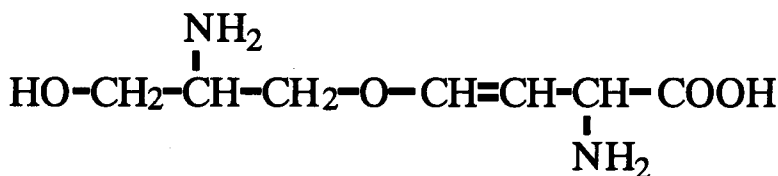
---

## リゾビトキシンの役割とは

マメ科植物は根粒菌の感染によって根粒という特殊な共生器官を形成する。そこでは根粒菌の窒素固定活性が誘導されると共に植物側からエネルギー源となる光合成産物が供給され、根粒菌により固定された窒素が植物側に効率的に利用されるといった共生系が確立している。

この根粒形成のメカニズムについては、近年の根粒菌の Nod 遺伝子の機能解析により感染初期における微生物-植物二方向分子シグナリングなど多くのことが明らかになってきている<sup>1)</sup>。しかし存在するであろう感染中期以降の分子シグナル系や、根粒菌の感染数及び成熟する根粒数の制限といった植物側の制御に関与するような微生物側の代謝産物とその働きについてはほとんど明らかにはなっていない。

リゾビトキシン (2-amino-4-(2-amino-3-hydroxypropoxy)-*trans*-but-3-enoic acid) (以下 RT) はダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium elkanii* 及び植物病原菌 *Burkholderia andropogonis* により生産される分子量 190 のアミノ酸様物質であり (図 1)、その生理学的作用としてメチオニン合成系にある L-cystathione から Homocystein への反応を触媒する  $\beta$ -cystathionase を強く阻害することが以前より知られている<sup>2)</sup>。そのため RT はメチオニン生合成阻害によってクロロシス誘導を引き起こす植物毒として一般的に認識されてきた。しかし 1971 年、RT がリンゴ果実のエチレン生合成を阻害する作用を持つことが報告されており、また以前からエチレンが



## Rhizobitoxine (M.W 190.2)

図 1. リゾビトキシンの構造式

根粒形成の抑制に働くといった報告が数多く成されてきた<sup>3)</sup>。加えて一昨年, Hypernodulation (根粒は一定数形成されると植物側の制御によりそれ以上形成されなくなるが, その制限を越えて多数の根粒が形成される現象)を起こす *Medicago truncatula* の表現型がエチレン低感受性であったことが報告された<sup>4)</sup>。これらの状況証拠から, 我々は RT がクロロシスを引き起こすだけの単なる植物毒ではなく植物ホルモンであるエチレンの生成を阻害し, 植物側の根粒数制御機構を攪乱することで, 根粒形成を促進する物質であるという仮説を立てた (図 2)。現在まで微生物側の代謝産物から植物側 autoregulation に関与するといった報告はなく, RT の新たな役割を明らかにすることより, 共生系の重要な知見が得られることが期待できる。

### 1. リゾビトキシンのエチレン生合成阻害と新規定量法の作成

一般に植物のエチレン生合成経路は図 3 のように示され, 経路の鍵酵素は S-adenosylmethionine (SAM) から ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) への反応を触媒する ACC synthase である。この酵素は以前に RT のアナログ物質である aminoethoxyvinylglycine (AVG) により強く活性阻害されることが報告されている<sup>5)</sup>。そこで我々は RT が阻害する反応もこのステップであると考え, 反応基質として SAM を, ACC 合成酵素としてトマト由来の bLE-ACS2 を用い, 生成 ACC をエチレン転換しガスクロマトグラフで測定する方法で実際に酵素活性における RT の影響

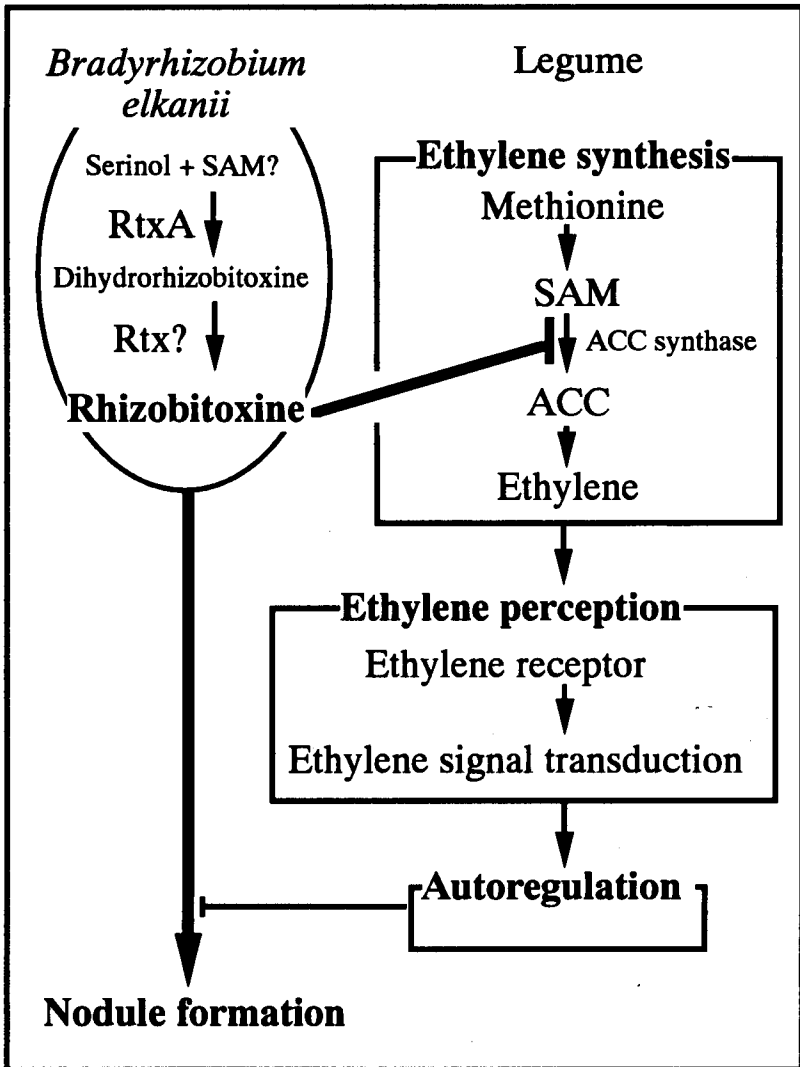


図 2. 作業仮説  
リゾビトキシンは根粒形成に有利に働くのか？

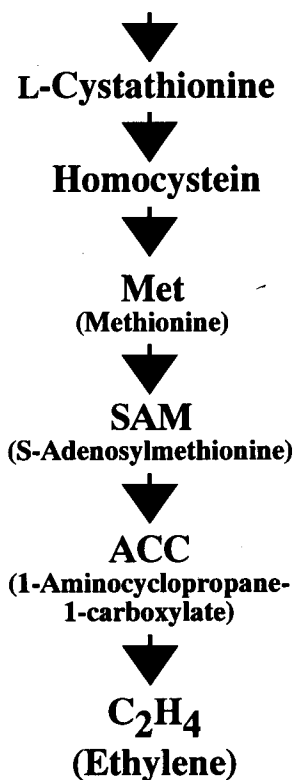


図 3. エチレン生合成経路

を検討した (図 4)。その結果, ACC 合成酵素に対する RT の  $K_i$  は  $0.025 \mu\text{M}$  と非常に低く, RT は ACC 合成酵素に非常に強い活性阻害を及ぼし, その阻害型は AVG ( $K_i = 0.019 \mu\text{M}$ ) と同様に拮抗阻害を示すことが明らかになった。この結果は, RT が働く標的部位はこれまで考えられてきたメチオニン合成系というよりはむしろエチレン生合成経路にある事を強く示唆するものである。

また, 従来の RT 定量法は, 低感度である, 夾雑物 (培地成分, 抗生物質, 菌の代謝物) により測定に大きな誤差を生じるといった問題があり, 今後研究を進める上で新しい高感度 RT 定量法の開発が重要であった。そこで, この酵素阻害を原理とした新規 RT 定量法を検討した所, 検出限界が

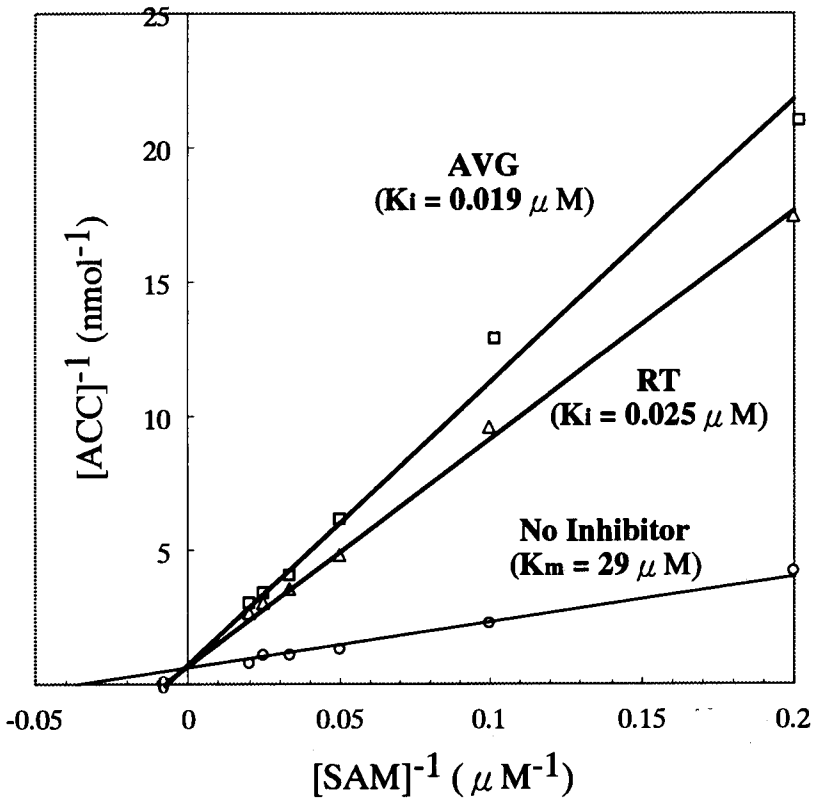


図4. リゾビトキシシンによる ACC 合成酵素活性の阻害

ACC 合成酵素は SAM ( $5\text{--}50 \mu\text{M}$ ),  $5 \mu\text{M}$  PLP,  $0.1 \text{ M}$  HEPES-KOH (pH 8.5) の条件で  $30^\circ\text{C}$ , 15 分間インキュベートした。阻害剤濃度は  $0.1 \mu\text{M}$  AVG, RT で行った。

約  $0.01 \mu\text{M}$  と高感度であり、夾雑物の影響を受けない、従来法と比べてより濃度依存性が高いといった特徴を持った新しい RT 定量法の確立に成功した (図5)。また RT 前駆体のジヒドロリゾビトキシシンを阻害物質として用いた時の効果は RT の約  $1/100$  を示した。これはジヒドロリゾビトキシシンが多量に含まれる培養液や根粒抽出液からの調製サンプルの RT 定量にも本方法を用いることで、ジヒドロリゾビトキシシンによる誤差影響をほぼ無視出来ることを意味している。

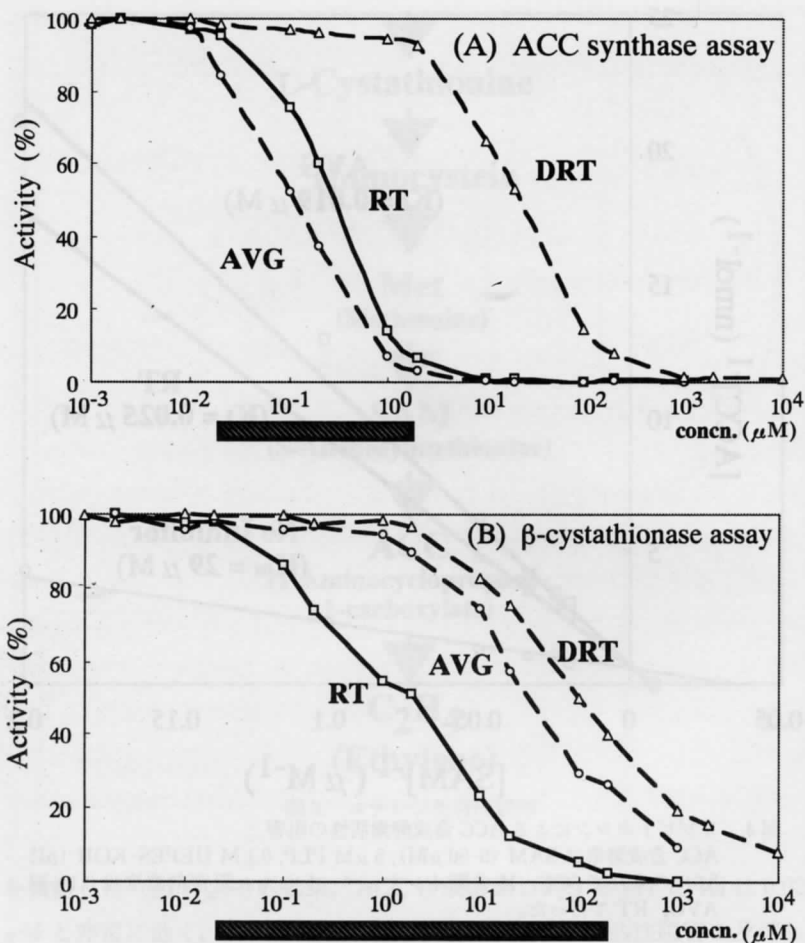


図5. 従来のリゾビトキシン定量法との比較

(A) 新規定量法: bLE-ACS2 由来の ACC 合成酵素の阻害

(B) 従来法: *E. coli* K12 由来の  $\beta$ -cystathionase の阻害

## 2. リゾビトキシン非生産株の構築

植物接種実験から RT の根粒形成における役割を検討する材料として、RT 生合成遺伝子破壊株を構築した。現在まで RT 関連遺伝子は *B. elkanii* USDA 61 株で一つ (*rtxA*) だけ報告されており、同株を用いた遺伝



子破壊 RT 非生産株が作成されている<sup>6)</sup>。しかし、この株は元々 RT 生産能が低いと、植物接種実験時の野生株との比較に困難を生じる。そこで多量に RT を生産する *B. elkanii* USDA 94 株を用いて、報告されている *rtxA* の遺伝子配列からプライマーを設計し、USDA 94 全 DNA をテンプレートとして PCR を行い約 3 kb の断片を得た。このシーケンスを行った所 USDA 61 の *rtxA* の塩基配列と 99.6%、推定アミノ酸配列と 98.9% の相同性があり、増幅した断片は USDA 94 の *rtxA* を含む領域であると考えられた。また、USDA 61 の *rtxA* の N 末部分はラットのセリン：ピルビン酸アミノトランスフェラーゼとアミノ酸レベルで 67%、C 末部分は酵母の *O*-アセチルホモセリンサルフィドラーゼと 76% の相同性があるが、それは USDA 94 の *rtxA* でも同様であり、かつこの酵素は提唱されている RT の生合成経路に適合した<sup>7,8,9)</sup>。得られた USDA 94 の *rtxA* 断片に対してカナマイシン耐性遺伝子カセットを相同組換えにより染色体に導入し、遺伝子破壊を行った。その後、作成した組み替え変異体 RTS2 の RT 生産能を前述の RT 定量法で検討し、RTS2 は RT 生産能を欠失したことを確認した。

### 3. RT 非生産変異株を用いた植物接種実験

#### (1) 親株と RT 非生産変異株を用いたエチレン発生量と根粒形成能の比較

RT 非生産変異株を用いてサイラトロへの接種実験を行い、植物根からのエチレンの発生量と根粒形成能が野生株と比較してどのように変化するか検討した。根粒菌を接種して6日後のサイラトロ根からのエチレン発生は、無接種に比べて野生株接種時には低く抑えられていた(図6)。一方、RT 非生産株を接種して6日後のサイラトロ根からのエチレン発生量は無接種時とほぼ等しいレベルまで回復した。この時の野生株と RT 非生産株の根粒形成曲線を比較したところ、根粒の出来始める時期や立ち上がりの傾きはそれぞれ変化はなかったが、10日目付近から変異株側の根粒形成曲線の傾きが緩くなり始め、最終的に野生株と比較して根粒数の減少を起こした(図7)。また、RT 非生産株接種と同時に RT アナログの AVG を外部投与

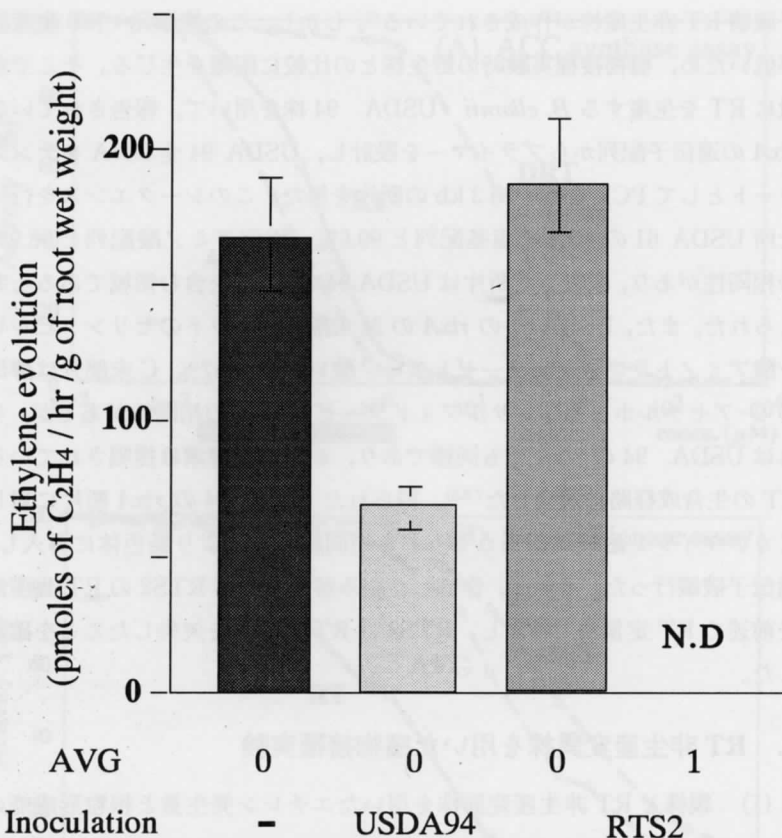


図6. *B. elkanii* USDA 94 及び RT-mutant RTS2 感染 6 日後のサイラトロ根からのエチレン発生

する実験では、根からのエチレン発生は抑えられ、最終根粒数は野生株接種時と同レベルまで回復した。これらの結果より、RT の働きは宿主のエチレン発生阻害とそれに続く根粒数制限にあることが示唆された。

## (2) ACC 投与実験

また、野生株をサイラトロへ接種すると同時にエチレン前駆体 ACC を投与するという実験を行った。ACC はエチレン生合成系において、RT が阻害する ACC synthase より下流の前駆体のため、野生株が生産する RT によるエチレン生成阻害は打ち消される。RT による根粒形成促進効果が

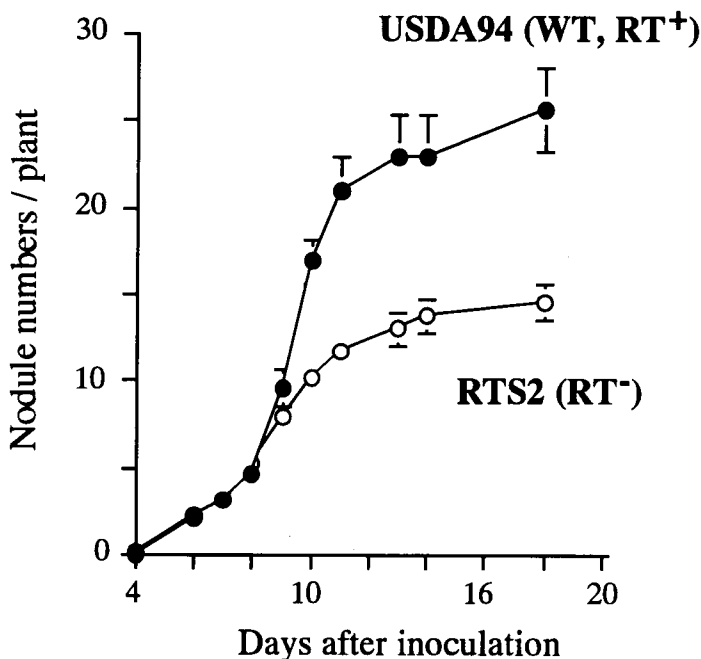


図7. サイラトロに対する *B. elkanii* USDA 94 及び RT-mutant RTS2 感染後の根粒形成曲線

エチレン生合成阻害に寄っているのならば、その根粒数は RT 非生産株のレベルまで減少すると予想される。結果は図 8, 9 に示した。菌接種・ACC 非投与区では、菌無接種と比べて約 15% のエチレン発生量を示し、ACC を  $1 \mu\text{M}$  同時投与することで菌無接種と比べて約 70%、ACC  $10 \mu\text{M}$  同時投与でほぼ 100% エチレン発生量が回復した。根粒形成曲線は ACC  $1 \mu\text{M}$ 、ACC  $10 \mu\text{M}$  同時投与では、最終根粒数の RT 非生産変異株を用いた実験時と同レベルまでの減少が観察された。これは ACC により発生したエチレンから根粒形成阻害効果が働いたためと考えられる。この結果は *B. elkanii* のつくる RT が、エチレン発生を阻害することで根粒数制限を抑制する事を更に支持している。

### (3) エチレンレセプター阻害剤、チオ硫酸銀 (STS) 投与実験

前述のように *M. truncatula* の Hypernodulation mutant がエチレン非

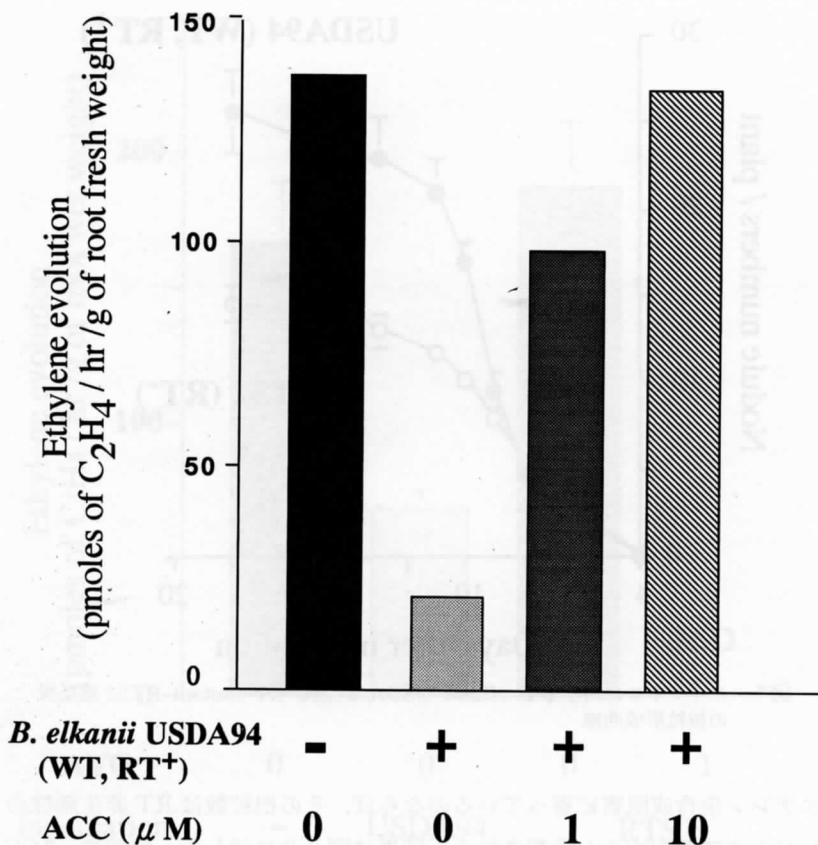


図8. *B. elkanii* USDA94 感染3日後のサイラトロ根からのエチレン発生

感受性という形質を持っていることから、根粒形成と宿主植物のエチレン感受に着目した。そこでエチレンレセプター阻害剤チオ硫酸銀 (STS) を投与することでエチレン受容が阻害され、続く根粒数制御機構が抑制されることを期待し、検討を行った。その結果、RTS2 株接合時において  $5\mu\text{M}$  STS 同時投与で、野生株接種時と同レベルの根粒数の回復が見られた (図10)。これは植物がエチレン感受から起こるシグナルトランスダクションを介して最終的な根粒数を制御していることを示唆している。

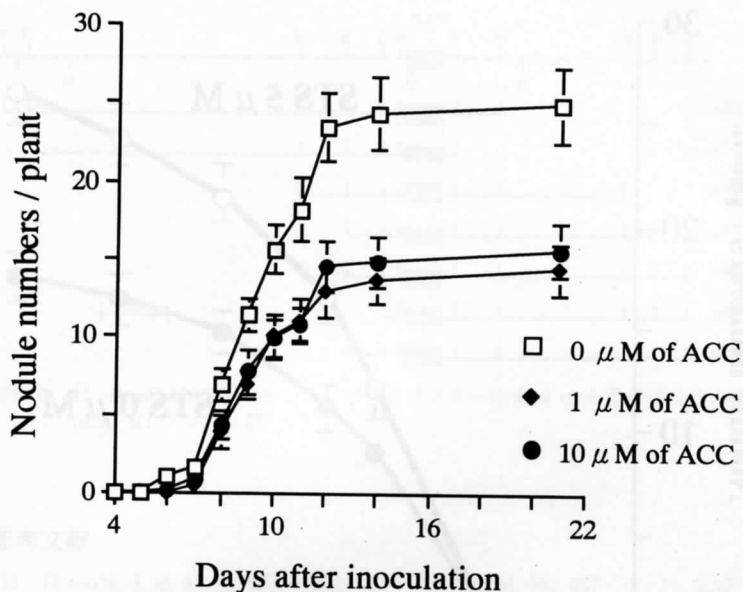


図9. サイマトロ根に対する *B. elkanii* USDA 94 感染後の根粒形成に及ぼす ACC の効果

#### 4. 遺伝子からのアプローチ

微生物の生合成系をコードする遺伝子は、染色体上でオペロンをなしている場合がある。そこで、RT 生合成関連遺伝子を広く検索するために、*rtxA* 周辺の領域のクローニングを行った。pLAFR1 で作成した *B. elkanii* USDA 94 のコスミドライブラリに対して破壊株構築時に得た PCR 産物をプローブとし、コロニーハイブリダイゼーションを行った結果、*rtxA* を含んだ7種類の異なるクローンを得た。これらのクローンの制限酵素地図を作成した結果、*rtxA* を中心として上流 23 kb, 下流 17 kb の合わせて約 40 kb の領域をカバーしていた(図 11)。手始めとして、これらのクローンの内、pRTF1, pRTN2, pRTS1 の3種類を RT 非生産株 *B. japonicum* USDA 110 に接合によって導入したが、残念ながら現在生産能付与は出来ていない。理由として、必要な遺伝子領域が足りない、合成が中間体でス

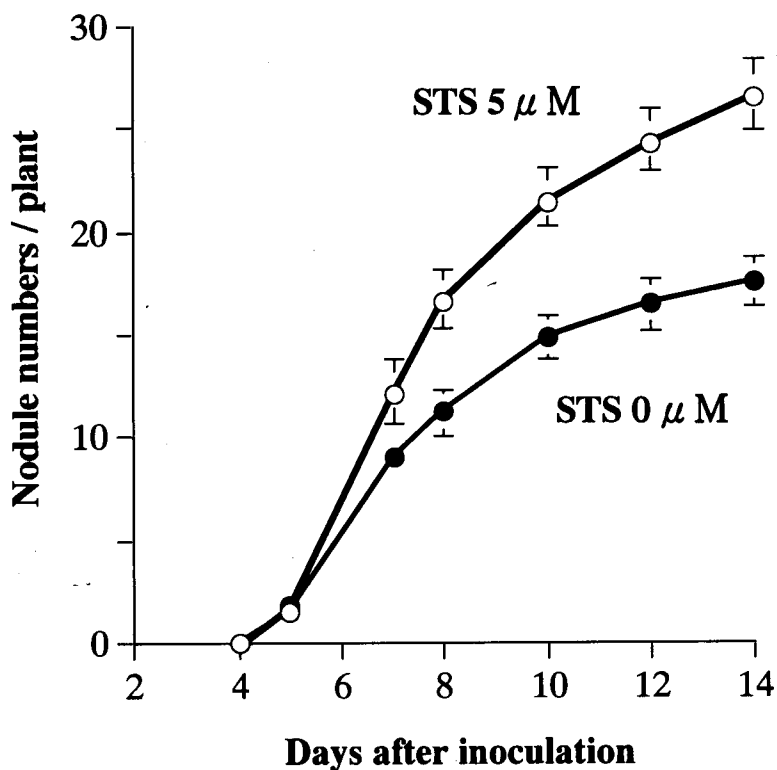


図 10. サイラトロ根に対する RT-mutant RTS2 感染後の根粒形成に及ぼす STS の効果

トップしている、プロモータが働いていないということが考えられる。しかし、この領域に新規の RT 関連遺伝子が存在する可能性は高い。現在、*B. japonicum* USDA 110 で働くプロモーターの導入とリゾビトキシン中間生成物の検出を検討すると同時に、*rtxA* 周辺の領域のシーケンスを行い、未知の ORF を検索中である。

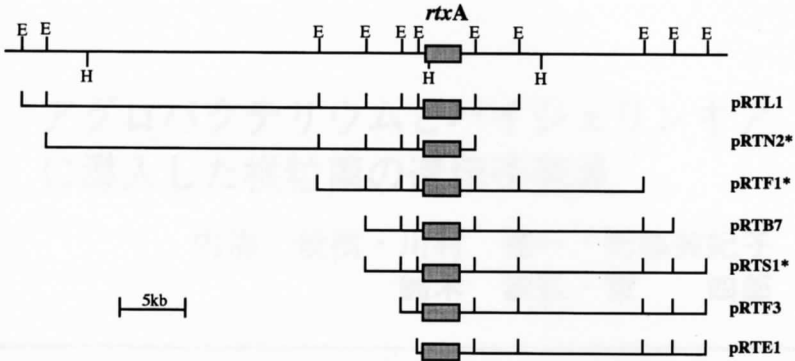


図 11. *B. elkanii* USDA94 ゲノミクライブラリー由来の *rtxA* 遺伝子を含んだ pLAFR1 クローン群

## 参考文献

- 1) Denarie, J. et al. (1992) Annu. Rev. Microbiol. 46: 497
- 2) Giovanelli, J., Owens, L.D. and Mudd, S.H. (1971) Biochim. Biophys. Acta 227: 671-684
- 3) Lee, K.H. and Larue, T.A. (1992) Plant Physiology 100: 1759.
- 4) Penmetsa, R.V. and Cook, D.R. (1997) Science 275: 527.
- 5) Yang, S.F. and Hoffman, N.E. (1984) Annu. Rev. Plant Physiol. 35: 155-189
- 6) Ruan, X. and Peter, N.K. (1992) J. Bacteriol. 174: 3467-3473.
- 7) Minamisawa, K. and Watanabe, H. (1986) Plant Cell Physiol. 27: 1109-1116
- 8) Mitchell, R.E. and Coddington, J.M. (1991) Phytochemistry 30: 1809-1814
- 9) Ruan, X., Zhang, C. and Peter, N.K. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2641-2645.





# アグロバクテリウムとバイジェリンキア に導入した根粒菌の遺伝子発現

内海 俊樹・川村 亮一・阿部美紀子  
鈴木 章弘・東 四郎

---

## 1. はじめに

地球環境が年々悪化していく一方では、増加の一途をたどる人口を支えるために農林業の生産性をさらに向上させる必要に迫られている。本来、土壤が兼ね備えている能力や生物の相互作用を利用した持続的な循環型の農業生産、あるいは、焼き畑農業などで失われた森林の回復などを実現していくうえで、植物とその共生微生物の働きを活性化させ、それぞれの地域環境に適応した形態で利用していくことは重要である。特に、このような植物と微生物の相互作用の代表である根粒菌とマメ科植物の共生窒素固定には、多くの期待が寄せられている。

根粒菌研究の重要な課題として、宿主植物域の拡大と高窒素固定活性の発現を挙げることができる。根粒菌とその宿主植物の間には、宿主特異性が存在し、例えば、ダイズ根粒菌は、ダイズにのみ根粒を形成し共生窒素固定を行う。根粒菌と宿主植物が互いに相手を認識し、根粒を形成し、根粒菌が植物の細胞内で窒素固定活性を発現するまでの過程に関わる、根粒菌と植物の遺伝子やシグナル分子の存在が明らかになってきている。しかし、宿主域拡大などの重要課題の解決には至っていない。そこで、根粒菌以外の細菌種に根粒菌の遺伝子を導入し発現することができれば、ひとつのブレイクスルーになるのではないかと考えた。根粒菌と系統が近ければ根粒菌の遺伝子を安定に維持・発現する可能性が高いと予想し、16S rRNA 遺伝子の塩基配列による進化系統樹に基づいて、*Agrobacterium*

*tumefaciens* と *Beijerinckia* にクローバ根粒菌の遺伝子を導入することを試みた。

*Agrobacterium tumefaciens* は、本来、多くの植物種を宿主として認識し根頭癌腫（クラウンゴール）を形成する植物病原菌であるが、Ti プラスミドを消去することにより病原性を失った A136 株を受容菌とした。アグロバクテリウムは窒素固定遺伝子群を保持していないので、根粒形成遺伝子群（*nod* genes）と窒素固定遺伝子（*nif* gene 等）の両方をコードしているクローバ根粒菌の共生プラスミド全体を導入することにした。*Beijerinckia* は、強い窒素固定活性を持つ単生窒素固定菌である。タイのイネ科植物 vetiver grass の根圏より単離された菌株であり、この植物に固定窒素を供給することにより緩い共生関係を成立させていると考えられる *Beijerinckia* sp. CR5 株を受容菌として、根粒形成遺伝子群のみを導入することにした。

## 2. 根粒菌の共生プラスミドの可動化とアグロバクテリウムへの導入

クローバを宿主植物とする根粒菌 4S 株 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 4S) は、525, 420, 315 kb のサイズが異なる 3 種のプラスミドを保持している。このうち、315 kb のプラスミドが共生プラスミド (pRt4Sa) であり、根粒形成遺伝子群（*nod* genes）及び窒素固定遺伝子（*nif* gene 等）が存在している<sup>1)</sup>。共生プラスミドをクローバ根粒菌より他の菌株へ自由に接合伝達することが可能となるように、pRt4Sa に Tn5-Mob<sup>2)</sup>を導入し、pRt4Sa::Tn5-Mob を得た。この pRt4Sa::Tn5-Mob を保持するクローバ根粒菌 4S5 株は、クローバに対する根粒形成能、共生窒素固定能とも野生型の 4S 株と違いは見られず、Tn5-Mob は pRt4Sa 上の *nod* genes や *nif* gene 以外の領域に挿入されたものと考えられた。次に、根粒菌とは分類上同じ「科」に属する *Agrobacterium* に pRt4Sa::Tn5-Mob を導入することを試みた。多くの植物にクラウンゴールを形成する *Agrobacterium tumefaciens* C58 株由来の菌株であり、Ti プラスミドの消去によりゴール形成能を喪失した *A. tumefaciens* A136 株を pRt4Sa::Tn5-Mob の受容

菌として接合を行った。カナマイシン耐性を選択マーカーとして得られた接合伝達株を AT4S シリーズとして解析した<sup>3)</sup>。AT4S シリーズの菌株がアグロバクテリウム由来であることは、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) によって確認した。

AT4S シリーズのプラスミドプロファイルを電気泳動で確認したところ、ほとんどの AT4S シリーズ (AT4SB, AT4SG 株など) でクローバ根粒菌の共生プラスミドが安定に保持されていることを確認できたが、共生プラスミドが検出できない菌株 (AT4Sa 株など) も存在した (図 1)。根粒形成遺伝子群の *nodC* 遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR<sup>4)</sup>、根粒

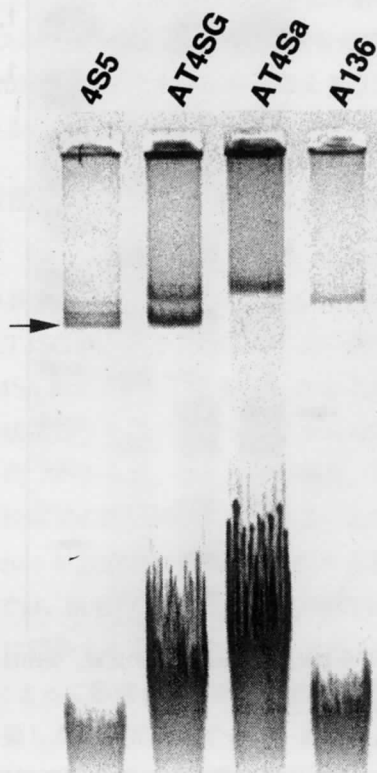


図 1 AT4S シリーズのプラスミドプロファイル。矢印は、クローバ根粒菌の共生プラスミド pRt4Sa:: Tn5-Mob を示す。

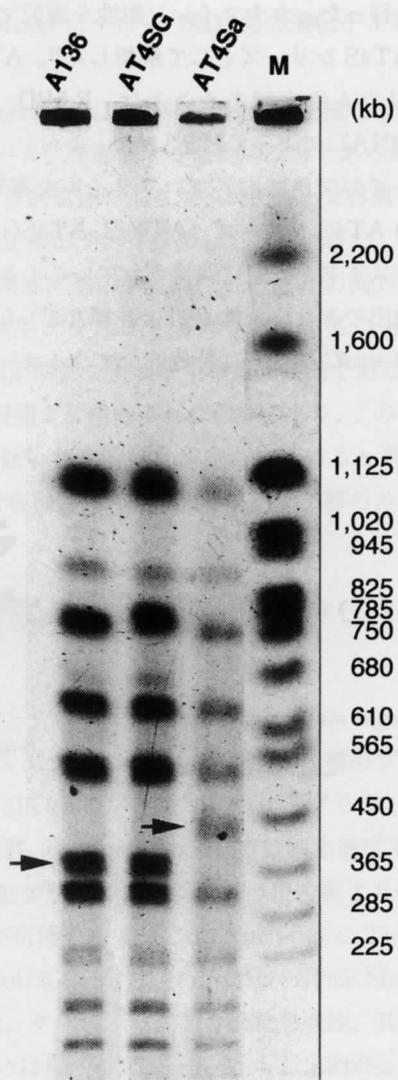


図2 CHEF 法による全 DNA の *Sva* I 断片の比較。矢印は、移動度がシフトした断片を示している。  
レーン M はサイズマーカー。

形成遺伝子群及び Tn5-Mob をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション、全 DNA の *Swa* I 断片の CHEF (Clamped Homogeneous Electric Field) 法による比較 (図 2) の結果、AT4Sa 株では共生プラスミドの一部 (少なくとも根粒形成遺伝子群及び Tn5-Mob を含む領域) が染色体に転移している可能性が示された。ミヤコグサを宿主とする根粒菌 (*Mesorhizobium loti*) では、染色体上の約 500 kb にも及ぶ範囲に根粒形成遺伝子群などが存在しており、この領域 (symbiosis island と呼ばれている) がそっくり別の菌株の染色体に転移する現象が報告されている<sup>5)</sup>。転移機構の詳細は不明であるが、染色体への組み込みには溶原性ファージによくみられるインテグラーゼ/tRNA のシステムが機能しているようである。クローバ根粒菌の共生プラスミド上の根粒形成遺伝子群も同様に symbiosis island を形成し、一つのユニットとして転移可能なのであろうか。クローバ根粒菌の根粒形成遺伝子の由来や水平伝播を考えるうえでも、非常に興味を持たれる問題である。

### 3. クローバ根粒菌の共生遺伝子群を保持するアグロバクテリウムの共生能

クローバ根粒菌の共生プラスミドを保持する AT4S シリーズの菌株である AT4SB 及び AT4SG 株、共生プラスミドの一部を染色体に取り込んだと考えられる AT4Sa 株をクローバに接種したところ、いずれも根粒が形成された。根粒形成遺伝子をアグロバクテリウムに導入し植物に接種した報告例は今までに幾つかあるが、ほとんどの場合、正常な感染の過程は辿らず、感染菌は根粒細胞の細胞間隙に存在するいわゆる pseudo nodule あるいは empty nodule が形成される<sup>6)</sup>。ところが AT4S シリーズの場合は、感染初期の段階では、根毛のカーリング及び感染糸の形成が観察され、根粒菌が本来の宿主に感染する過程と全く同じであった。形成された根粒は、クローバ根粒菌によって形成される根粒と形態的にはよく似ており、その根粒細胞内部に感染した菌が充満していた。走査型及び透過型電子顕微鏡による観察では、根粒細胞内部の感染菌はペリバクテロイド膜に包まれ、菌体は肥大化し変形している様子が観察でき、形態的にはバクテロイド化

していることが明らかとなった。これらのことは、根粒形成に関しては、導入したクローバ根粒菌由来の遺伝子がアグロバクテリウム内で発現し正常に機能していることを示している。しかしながら、アセチレン還元法ではニトロゲナーゼ活性は検出されなかった。クローバ根粒菌の共生プラスミド消去株である H1 株に AT4Sa 株の共生プラスミドを導入して得られた菌株は、クローバに窒素固定能のある根粒を形成したことから、AT4Sa 株の共生プラスミドに変異が起きている可能性は否定された。AT4Sa 株では、何らかの理由で窒素固定遺伝子群が機能していないのである。Martinez ら<sup>7)</sup>は、A136 株と同じ *A. tumefaciens* C58 株由来の Ti プラスミド消去株である GMI9023 株にインゲン根粒菌 (*R. phaseoli* CFN299 株) の共生プラスミドを導入した接合伝達株が、インゲンに窒素固定活性のある根粒を形成できることを報告している。宿主植物とその根粒菌の応答の違いという問題もちろん考慮しなければならないが、クローバ根粒菌とインゲン根粒菌の共生プラスミドの違いを遺伝子レベルで比較することにより、宿主植物細胞内での窒素固定遺伝子群の発現調節にかかわる機構が明らかになってくるかもしれない。比較的広い宿主域を持つ根粒菌 *Rhizobium* NGR234 株の共生プラスミドの全塩基配列が明らかにされた<sup>8)</sup>が、種々の根粒菌の共生プラスミドについて塩基配列を決定し比較することも重要な課題であろう。

AT4S シリーズの宿主植物域を調べるために、アルファルファ (*Medicago sativa*)、カラスノエンドウ (*Vicia hirsuta*)、ダイズ (*Glycine max*)、モヤシマメ (*Vigna mungo*)、シラトロ (*Macroptilium atropurpureum*) に AT4SB 株、AT4SG 株及び AT4Sa 株を接種した。その結果、AT4SB 株はクローバ以外の植物には根粒形成しなかったが、AT4SG 株はアルファルファに、AT4Sa 株はカラスノエンドウにそれぞれ根粒を形成した。AT4SG 株の根粒形成過程と根粒形成遺伝子群の発現産物について詳細に検討した。AT4SG 株をアルファルファに接種した場合、根粒細胞内に感染菌が存在しない empty nodule が高頻度で形成された。empty nodule は、おそらく、宿主植物の細胞間隙に進入した AT4SG 株が誘導したものと考えられる。これは、アグロバクテリウム A136 株にアルファルファ根



ロバクテリウムは根粒菌の共生プラスミド上の遺伝子を発現し、植物と共生窒素固定系を成立させる潜在能力がありそうである。ただし、共生プラスミドとそれを受け取るアグロバクテリウム菌株の組み合わせによっては、うまく発現・機能しない遺伝子があり、そのために empty nodule の形成に終わったり、宿主細胞に侵入し形態的にはバクテロイド化するものの窒素固定活性の発現までには至らなかったりといったバリエーションが出てくるのではなかろうか。そのように考えると、宿主植物との共生系成立に関与する遺伝子群の発現調節に特徴的な因子の存在も予想され、本冊子の三井氏の転写調節因子に関する話題も大変興味深い。

根粒菌とその宿主植物との相互認識にかかわる重要なシグナル分子のひとつとして、根粒菌の根粒形成遺伝子群の発現産物である Nod ファクターがある。Nod ファクターは、3 から 5 分子の N-アセチルグルコサミンを構成糖とするキトオリゴサッカライドが基本骨格であるが、根粒菌種によって修飾基などが異なっており、その違いが宿主特異性を決定づけているとされている<sup>9)</sup>。AT4SG 株はクローバとアルファルファ双方に根粒形成可能であるが、アルファルファが共生相手と認識できる Nod ファクターを生産しているのであろうか。アルファルファ根粒菌が生産する Nod ファクターは、硫酸基を持つという特徴的な構造をしているため、クローバ根粒菌の生産する Nod ファクターとは薄層クロマトグラフィーで容易に区別できる。<sup>14</sup>C-グルコースまたは <sup>35</sup>S-硫酸マグネシウム、及び、根粒形成遺伝子群の発現誘導物質を含む培地にて AT4SG 株を培養し、培地中に放出された Nod ファクターを分析したところ、アルファルファ根粒菌と同じ Nod ファクターは検出できなかった。AT4SG 株と親株であるクローバ根粒菌 4S 株が生産する Nod ファクターの構造を決定し、アグロバクテリウムが Nod ファクターの構造に変化をもたらしうるのは明らかになることは重要である。

#### 4. *Beijerinckia* への根粒菌の共生遺伝子の導入と発現

*Beijerinckia* sp. CR5 株はタイの土壌から分離された単生窒素固定細菌であり、vetiver grass というイネ科植物の根圏に生息し緩い共生系を確立



しているといわれている。*Beijerinckia* は、16S rRNA の全塩基配列に基づいた系統解析で、アグロバクテリウムやクロワバ根粒菌などと比較的近い類縁関係にある。*Beijerinckia* sp. CR5 株は強い窒素固定活性を保持しているので、クロワバ根粒菌由来の根粒形成遺伝子群のみを導入することにした。クロワバ根粒菌 ANU843 株の根粒形成遺伝子群 (約 14 kb) を連結した広宿主域プラスミド pRt032<sup>10)</sup> を接合伝達により *Beijerinckia* sp. CR5 株に導入した。得られた接合伝達株 TC150 株の培養液は、CR5 株と同程度の窒素固定活性を示し、pRt032 の存在は窒素固定活性を阻害しないことを確認した。TC150 株をクロワバに接種したところ、根毛の変形が観察された。感染糸の形成は観察できなかったが、菌接種後 1 ヶ月経過するころから根粒様構造が形成された (図 4)。走査型電子顕微鏡では維管束は根粒の中

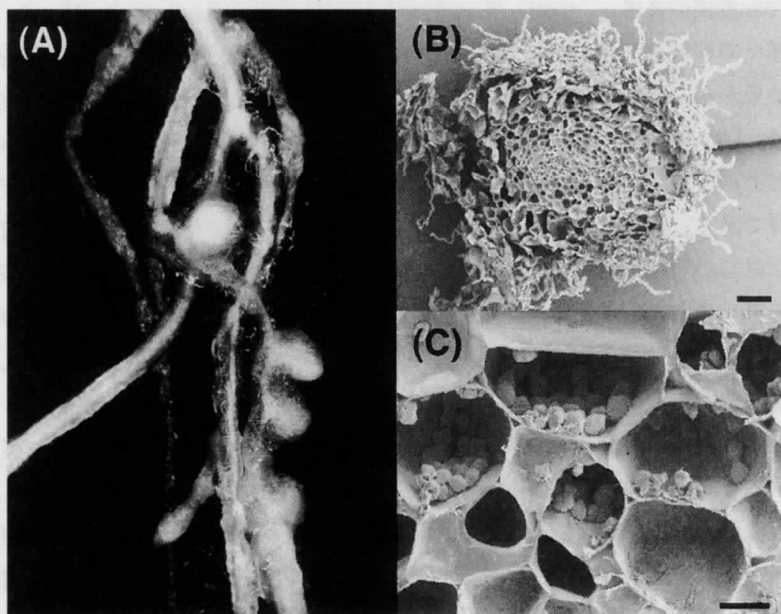


図 4 *Beijerinckia* TC150 株によりクロワバの根に形成された根粒様構造。A, 根粒様構造の全体像。: B, 根粒様構造の横断面 (SEM 像)。維管束は中心部に存在する。バーは 100  $\mu\text{m}$ 。: C, 細胞内の様子 (SEM 像)。クロワバ細胞内部には感染菌の存在は認められない。デンプン粒と思われる顆粒が存在する。バーは 10  $\mu\text{m}$ 。

心にあり、また、根粒細胞内には感染菌は観察されず、empty nodule であることが明らかとなった。*Beijerinckia* sp. CR5 株の接種では、クローバの根には殆ど変化は観察されない。根毛の変形や empty nodule の形成は、*Beijerinckia* sp. CR5 株に導入した根粒形成遺伝子群が機能した結果であると考えられる。しかし、TC150 株によって形成された empty nodule は、窒素固定活性は検出できなかった。接種試験は無窒素源、無炭素源の培地でクローバを栽培して行い、しかも、TC150 株は根粒細胞内には侵入していないため植物からの炭素源の供給が少なく、大量のエネルギーを必要とする窒素固定活性を発現するには至らなかった可能性がある。TC150 株の接種後、適当な時期に炭素源を添加するなどの工夫により窒素固定活性を発現させることができるかどうか、また、固定された窒素がクローバに効率良く供給されるかどうか確認する必要がある。TC150 株の宿主植物域の検討も重要である。

種々の根粒菌の根粒形成遺伝子や 16 S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析の結果から、根粒形成遺伝子の水平伝播ということがいわれている。根粒菌は、「マメ科植物と共生窒素固定を行う」という共通した能力をもっているものの、染色体上の遺伝子を指標とした場合にはかなり多様性に富んだ菌群である。従って、さまざまな土壤環境、特に通常の根粒菌が生育不可能な厳しい土壤環境に適応して生息する細菌の中には、根粒菌の共生遺伝子を導入すれば、植物との共生関係を確立できる菌株が存在することも考えられる。根粒菌の菌株改良の方法として、根粒菌に有用な遺伝子を導入する方法が一般的である。しかし、ひとつの形質に複数の遺伝子が関与している場合もあり、応用的側面を考慮すると困難が予想される。また、実験室内で開発された根粒菌株が、自然の土壤環境で能力を十分に発揮するためには、土壤の pH や金属イオン濃度、土着菌との競合など克服すべき問題がある。アグロバクテリウムや *Beijerinckia* 以外の細菌にも根粒菌の遺伝子導入実験を試みていけば、根粒形成遺伝子や窒素固定遺伝子の安定した発現に必要な条件が明らかとなってくるであろう。ある土壤環境に適応した細菌群の中から根粒菌の遺伝子を維持・発現可能な菌株を探索し、そして、そのような菌株に根粒菌の共生遺伝子を導入することにより、その

環境により適した新しい共生菌を作り出すということも可能ではないだろうか。

## 参考文献

- 1) Uchiumi, T., Ono, Y., Abe, M. and Higashi, S. (1989) J. Gen. Microbiol. **135**: 3133-3141.
- 2) Simon, R. (1984) Mol. Gen. Genet. **196**: 413-420.
- 3) Abe, M., Kawamura, R., Higashi, S., Mori, S., Shibata, M. and Uchiumi, T. (1998) J. Gen. Appl. Microbiol. **44**: 65-74.
- 4) Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N. and Matsuguti, T. (1995) J. Bacteriol. **177**: 468-462.
- 5) Sullivan, J.T. and Ronson, C.W. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 5145-5149.
- 6) Hirsch, A.M., Wilson, K.J., Jones, J.D., Bang, M., Walker, V.V. and Ausubel, F.M. (1984) J. Bacteriol. **158**: 1133-1143.
- 7) Martinez, E., Palacios, R. and Sanchez, F. (1987) J. Bacteriol. **169**: 2828-2834.
- 8) Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W.J., Rosenthal, A. and Perret, X. (1997) Nature **387**: 394-401
- 9) Spaink, H.P. (1995) Annu. Rev. Phytopathol. **33**: 345-368
- 10) Schofield, P.R., Ridge, R.W., Rolfe, B.G., Shine, J. and Watson, J.M. (1984) Plant Mol. Biol. **3**: 3-11



# *Streptomyces* 属放線菌のキチナーゼ 遺伝子の構造と発現制御

齋藤 明広<sup>1,2</sup>・藤井 毅<sup>1</sup>  
米山 忠克<sup>2</sup>・宮下 清貴<sup>1</sup>

キチンは、*N*-アセチルグルコサミンを単体とする直鎖状高分子化合物であり、セルロースに次いで最も自然界に大量に存在するバイオマス資源である。また、キチンオリゴマーは、植物に対してエリシター活性を有しており、その誘導体は根粒形成においてシグナル物質として作用するなど、様々な生理活性を有することで注目を集めている。一方、キチンを加水分解する酵素キチナーゼは、生体成分としてキチンを有する生物はもとより、キチンを生体成分としてもたない生物にも広く存在し、それぞれの生物において多様な生理的機能を有していることが明らかになりつつある。ここでは、まず、キチナーゼの分布、機能、および分類について記し、次に、植物の病原性糸状菌に対する防御、および、外性菌根形成における植物キチナーゼの機能について簡単に紹介したい。最後に、我々が展開している *Streptomyces* 属放線菌のキチナーゼ遺伝子の研究について概要を記す。

## 1. キチナーゼの分布、機能、および分類

キチナーゼ (EC 3. 2. 1. 14) は、キチンを加水分解する酵素であり、キチンを生体の構成成分としてもつ甲殻類、昆虫、菌類はもとより、キチンを生体成分として持たない哺乳動物、植物、細菌、ウイルスといった多くの生物に広く存在する。

生体の構成成分としてキチンを持つ甲殻類、昆虫、菌類などの生物では、

---

<sup>1</sup>農業環境技術研究所, <sup>2</sup>筑波大学院農学研究科応用生物科学系

キチナーゼは、脱皮や菌糸の伸長など、生物の生育、生長に必須である。一方、キチンを生体成分に持たない生物のうち、植物では、キチナーゼが糸状菌の生育を抑制する<sup>1-3)</sup>こと、および、植物キチナーゼの多くがPRタンパク質 (Pathogenesis-Related Proteins) であることから、キチナーゼは生体防御に関わっていると考えられているが、若干の議論の余地を残している。また、外性菌根の形成に植物キチナーゼが重要な役割を果たしていることを示唆する論文も報告されている<sup>4)</sup>。これらについての詳細は、次節2で述べる。哺乳動物においては、キチナーゼの生理的機能はほとんど不明であるが、モルモットの血中のキチナーゼ活性が病原性糸状菌の感染によって上昇することや、人のマクロファージでキチナーゼ遺伝子に高い相同性を示すキトトリオシダーゼ遺伝子が発現すること<sup>5)</sup>から、哺乳動物においても、キチナーゼは、生体防御に関与していると考えられている。キチン分解能を有する細菌は、海洋、土壌を問わず、様々な環境に分布し、細胞外 (グラム陰性菌のペリプラズムを含む) にキチナーゼを分泌することによって、環境中に存在するキチンを加水分解し、炭素源あるいは窒素源として資化する。細菌キチナーゼは、自然界で大量に生産されるキチンの分解過程を担い、生態系の炭素や窒素の循環において重要な役割を有している。

以上のように、キチナーゼは様々な生物に分布し、多様な役割をもっている。それゆえ、キチナーゼに関する研究は盛んであり、これまでに、様々な生物から多くのキチナーゼが精製され、クローニングされたキチナーゼ遺伝子は既に 100 (このうち、細菌および植物由来のものがそれぞれ 30 以上を占める) を超える。

Henrissat らは、キチナーゼを含む全ての糖質加水分解酵素をアミノ酸配列の相同性に基づいて 45 のファミリーに分類し、その結果、全てのキチナーゼが、ファミリー18と19の2つのファミリーに分類されることを示した<sup>6,7)</sup>。これら2つのファミリーに属するキチナーゼの間には、アミノ酸配列の相同性はなく<sup>6,7)</sup>、タンパク質としての立体構造が異なる<sup>8)</sup>。また、キチンの加水分解における反応機構も異なり<sup>9,10)</sup>、両ファミリーに属するキチナーゼは進化的に起源が異なるものと考えられている。ファミリー18キチ

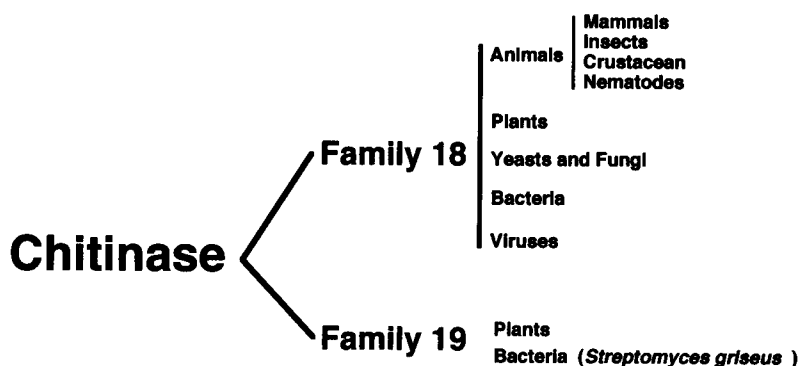


Fig. 1. キチナーゼの分類と生物界における分布<sup>38)</sup>。哺乳動物、昆虫、甲殻類、植物、菌類、細菌、ウイルスに存在するキチナーゼの全ては、糖加水分解酵素の分類群のファミリー18と19のいずれかに分類される<sup>6,7)</sup>。

ナーゼ遺伝子がキチナーゼを有する生物全般に存在するのに対し、ファミリー19 キチナーゼ遺伝子が、ただ1つの例外を除いて、高等植物に特異的に存在することは、両ファミリーのキチナーゼ遺伝子の進化を考える上で興味深い (Fig. 1)。ファミリー19 キチナーゼ遺伝子を有する高等植物以外の生物は、1996年までは、我々が研究対象としている *Streptomyces* 属放線菌のうちの1種、*S. griseus* のみであった<sup>11)</sup>。細菌キチナーゼは、*S. griseus* の生産するファミリー19 キチナーゼ以外は、全てファミリー18に属し、それらのキチナーゼは、触媒ドメインのアミノ酸配列の相同性から、さらに3つのグループ A, B, C に分類される<sup>12)</sup>。

## 2. 病原性糸状菌の防御、および、外性菌根形成における植物キチナーゼの機能

植物は、キチンを生体成分としてもたないが、多くの種類のキチナーゼを生産する。植物キチナーゼについては、病原性糸状菌に対する防御反応に主眼が置かれ、エリシターによって生産が誘導されるキチナーゼを対象とし、それらのPRタンパク質としての役割について主に研究が行われてきた<sup>13,14)</sup>。それらの研究により、誘導型キチナーゼの多くは、*in vitro* で糸状菌溶菌活性を有すること<sup>1-3)</sup>、タバコの根においてキチナーゼを過剰発現

させると、病原性糸状菌の防御に効果があること<sup>15,16)</sup>が示された。また、コムギやニンジンのキチナーゼは、病原性糸状菌の細胞壁を分解することでエリシター活性を有するキチンオリゴマーを生産し、防御反応のシグナルを強めていると推測されている<sup>17,18)</sup>。これらの結果を背景にして、細菌や糸状菌のキチナーゼを植物で発現させることで、病原性糸状菌に対する抵抗性を強化する試みが数多くなされている<sup>19)</sup>。

一方、北半球のほとんどの森林植物には菌根菌が共生している<sup>4)</sup>が、菌根菌は糸状菌であるという点においては病原性糸状菌と同じである。しかも、外性菌根菌 (*Hebelama crustuliniforme*) の分泌物中には、その宿主植物であるトウヒ (*Picea abies*; spruce) に対して、エリシター活性を有する画分が存在し、病原性糸状菌のそれらと同様に、植物の防御反応を引き起こす<sup>20)</sup>。その一方で、上記の非共生状態の外性菌根菌の分泌物中のエリシター活性は、トウヒの培養細胞の分泌物 (キチナーゼ活性を有する) によって低下すること<sup>20)</sup>や、宿主植物のキチナーゼ活性が高いときに最もよく菌根が形成されること<sup>21)</sup>から、菌根菌の感染にキチナーゼが関与する可能性が示唆されてきた。

1997年にSalzerらによって、上述のトウヒの根の培養細胞より、構成的に生産される2つの植物キチナーゼ (ファミリー19) が精製された<sup>4)</sup>。これらのキチナーゼは、トウヒに感染する外生菌根菌 (*Hebelama crustuliniforme*, *Amanita muscaria*, および *Suillus variegatus*) の生産するエリシター画分の活性を低下させた。また、多くの植物キチナーゼが *in vitro* で糸状菌溶菌活性を示し、それらの生育を抑制するのに対し、これらの2つのキチナーゼは、共生相手となる上記の3種の菌根菌の生育を抑制しなかった。これらのことから、Salzerらは、トウヒの根において構成的に生産されるキチナーゼは、分泌後アポプラストに存在し、菌根菌によって生産されるエリシター物質 (この場合はおそらくキチンオリゴマー) が、細胞表層のエリシターレセプターに到達する前に分解されるというモデルを提唱し、その結果、菌根菌が植物根に感染可能になると考えている。しかしながら、トウヒの培養細胞の分泌物は、病原性糸状菌の生産するエリシター画分の活性も、菌根菌のそれらと同様に低下させるため<sup>20)</sup>、このモデル



が菌根菌の感染に特異的であるか否かについては、不明である。Salzer らの提唱するモデルはこのような問題を残しているが、植物におけるキチナーゼの新たな機能を示唆するものとして興味深いものである。

### 3. *Streptomyces* 属放線菌のキチナーゼ遺伝子の構造と発現制御

代表的な土壌細菌である *Streptomyces* 属放線菌は、キチン分解能を有することが1つの特徴であり、土壌中の主要なキチン分解細菌であると考えられている。土壌にキチン添加すると、*Streptomyces* 属放線菌数が増加し、糸状菌による植物病害が軽減されることから<sup>22,23)</sup>、*Streptomyces* 属放線菌は土壌中で病原性糸状菌に対する抑制効果を持つと考えられている。また、*Streptomyces* 属放線菌が糸状菌溶菌活性を有し<sup>24,25)</sup>、その糸状菌溶菌活性にキチナーゼが関わることを示されており、これらのことから、*Streptomyces* 属放線菌のキチナーゼは、植物病原性糸状菌のバイオコントロールへの応用においても着目されている。

酵素レベルの研究においては、Berger と Reynolds<sup>26)</sup> により、*S. griseus* の生産する2つのキチナーゼが精製され、それらの酵素学的性質が決定された。これ以降も、複数のキチナーゼが *Streptomyces* 属放線菌より精製されている<sup>27-29)</sup>。これらの酵素レベルでの研究から、*Streptomyces* 属放線菌の生産するキチナーゼは、多重酵素であり、酵素学的性質において多様であることが示されている。

1980年代後半になると、遺伝子レベルでの研究が行われ、キチナーゼを生産する細菌からのキチナーゼ遺伝子のクローニングが開始された。我々は、*Streptomyces lividans* より、3つの異なるキチナーゼ遺伝子をクローニングした<sup>30-32)</sup>。これらの遺伝子の解析により、これらの産物がドメイン構造を有すること、また、それらのうちの1つはファミリー18のグループAに属し、残りの2つは、グループBに属することが明らかになった。一方、Ohno らは、植物以外で初めて、*S. griseus* より、ファミリー19キチナーゼ遺伝子をクローニングした<sup>11)</sup>。その他の研究グループによって、他の3種の *Streptomyces* 属放線菌よりファミリー18キチナーゼ遺伝子が

1つずつクローニングされている<sup>33~35)</sup>。これらの遺伝子にコードされるキチナーゼのドメイン構造を Fig. 2 に示した。

近年, Redenbach らによって, *Streptomyces* 属放線菌の中で分子生物学的解析が最も進んでいる *S. coelicolor* に関し, 染色体整列コスミドライブラリーが作成され<sup>36)</sup>, 遺伝子のマッピングやクローニングを容易に行うことが可能となった。そこで *S. coelicolor* の染色体整列コスミドライブラリーから, ハイブリダイゼーションによってキチナーゼ遺伝子をクローニングし, 塩基配列の決定, および大腸菌での発現解析を行った。その結果, ゲノムプロジェクトによって存在が示された1つのキチナーゼ遺伝子を加えると, *S. coelicolor* は, 7つの異なるキチナーゼ遺伝子 (*chiA*, *chiB*, *chiC*, *chiD*, *chiE*, *chiF*, *chiG*) を有することが明らかとなった<sup>37)</sup>。これら7つの遺伝子がコードするキチナーゼのうち, 糖加水分解酵素の分類におけるファミリー18に属するものは5つ (*ChiA*, *ChiB*, *ChiC*, *ChiD*, *ChiE*), ファミリー19に属するものは2つ (*ChiF*, *ChiG*) である。高等植物以外の生物で, 両ファミリーに属するキチナーゼ遺伝子を有することが示されたのはこれが初めてである。これらの遺伝子は, クラスターは形成していないものの, 各ファミリーごとに, ある程度局在して, 染色体上に位置する (Fig.

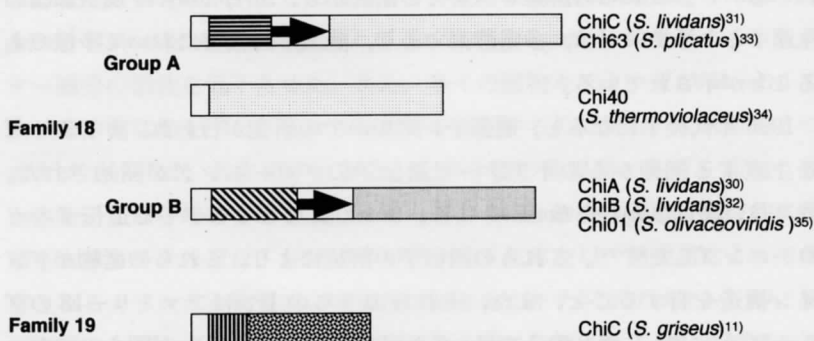


Fig. 2. 1996年までに5種の *Streptomyces* 属放線菌よりクローニングされた7つのキチナーゼ遺伝子のコードするタンパク質のドメイン構造<sup>38)</sup>。白い部分, 縞の部分, 矢印の部分, および点の部分は, それぞれシグナル配列, 基質結合ドメイン, フィブロネクチンタイプIII様ドメイン, および触媒ドメインを示す。

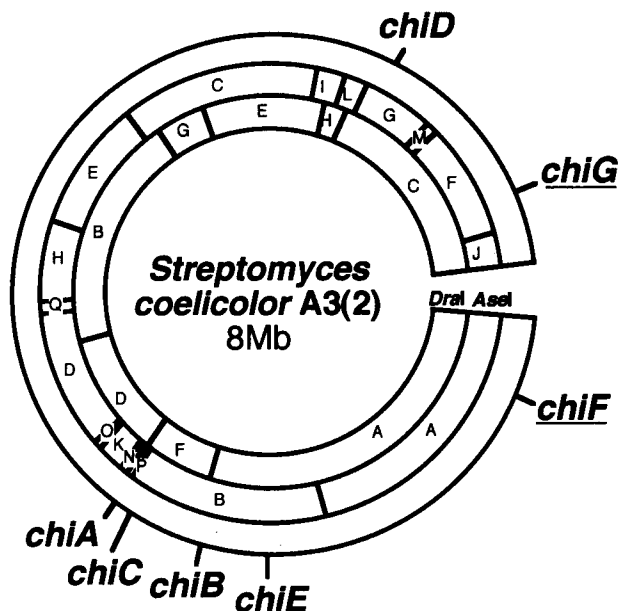


Fig. 3. *Streptomyces coelicolor* A3(2) のキチナーゼ遺伝子の染色体上における位置<sup>37)</sup>。最も内側の円と中間の円には、それぞれ、*DraI* と *AseI* の切断認識部位を示し、各キチナーゼ遺伝子の位置を外側に示した。ファミリー19 キチナーゼ遺伝子は、下線をつけて示した。

3)。また、これら7つの遺伝子のコードするキチナーゼは、多様なドメイン構造をとっている (Fig. 4)。他のキチン分解細菌の場合は、クローニングされているキチナーゼ遺伝子の数は多くとも3つであること、また、それらの全てはファミリー18キチナーゼ遺伝子であることを考えると、*S. coelicolor* は極めて多様なキチナーゼ遺伝子を有していることがわかる。さらに、*S. coelicolor* の有する7つのキチナーゼ遺伝子について、他の *Streptomyces* 属放線菌における分布をサザンハイブリダイゼーションによって調べたところ、それらのキチナーゼ遺伝子のほとんどのホモログが *Streptomyces* 属放線菌に広く分布することが示唆された<sup>38)</sup>。このことから、*S. coelicolor* に限らず、*Streptomyces* 属放線菌は、多様なキチナーゼ遺伝子を有すること示唆された。

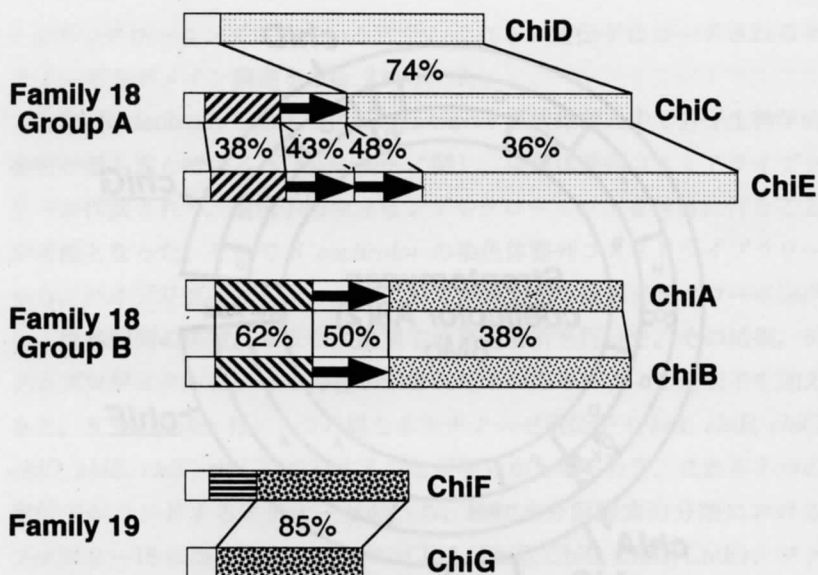


Fig. 4. *Streptomyces coelicolor* A3(2) のキチナーゼ遺伝子産物のドメイン構造<sup>37)</sup>。キチナーゼの分類 (ファミリー18のグループA, ファミリー18のグループB, ファミリー19) ごとに示した。白い部分, 縞の部分, 矢印の部分, および点の部分は, それぞれシグナル配列, 基質結合ドメイン, フィブロンネクチンタイプIII様ドメイン, および触媒ドメインを示す。各ドメイン間のアミノ酸配列の相同性 (一致%) をともに示した。

*S. coelicolor* の有するこれらの7つのキチナーゼ遺伝子について, ノーザンハイブリダイゼーションによる転写レベルでの発現の解析を行った結果, 7つのキチナーゼ遺伝子のうち, 5つ (*chiA*, *chiB*, *chiC*, *chiD*, *chiF*) は, コロイド状キチンの存在下で転写が誘導された<sup>38)</sup>。この結果から, これらの5つのキチナーゼ遺伝子が, キチン分解において主要な役割を果たしていることが推測される。キチン分解におけるこれら5つの遺伝子のコードするキチナーゼのそれぞれの役割については, 今後の課題である。

*Streptomyces* 属放線菌のキチナーゼ生産は, キチンの存在下で誘導される<sup>39)</sup>, グルコースの共存下で抑制される<sup>40)</sup>。これらのキチナーゼの生産制御は, 転写レベルで行われている<sup>30,31,33)</sup>。

これまでに *Streptomyces* 属放線菌よりクローニングされたキチナーゼ遺

伝子のほとんどのプロモーター領域には、-35 を挟む形で、12 bp よりなる共通の繰り返し様配列が存在する<sup>32,37)</sup>。これらの配列は、点変異を導入すると、転写が構成的になったり、誘導レベルが低くなるなどのキチナーゼ遺伝子の発現制御に変化がおこることから<sup>31,41,42)</sup>、発現制御において重要であることが示されている。また、この繰り返し様配列を認識するタンパク質の存在が示唆されており<sup>41)</sup>、これらの配列は転写制御タンパク質の認識結合サイトであると考えられる。

一方、キチナーゼ遺伝子の転写は、基質であるキチンの存在下で誘導されるが、水に不溶性のキチンが直接的に誘導物質として機能しているかどうかについては不明であった。我々は、*S. livdans* のキチナーゼ遺伝子 *chiA*<sup>31)</sup> のプロモーターからの転写活性を、レポーター遺伝子としてカテコール-2,3-ジオキシゲナーゼ遺伝子を用いて測定し、キチナーゼ遺伝子の発現誘導物質を同定した<sup>43)</sup>。誘導物質として、キチンオリゴマー (2, 3, あるいは 4 糖) を用いた解析の結果、2 糖 (キトビオース) の場合には、添加後 2 時間で有為な転写活性が誘導されるが、3 糖や 4 糖の場合には、転写の誘導時期がキトビオースに比べ、添加後 6 時間と遅れた。また、これらの誘導物質とともに、ファミリー 18 キチナーゼの阻害剤であるアロサミジンを加えると、キトビオースの場合には、アロサミジンの有無に関係なく *chiA* の転写誘導がおこるのに対し、3 糖や 4 糖の場合には、アロサミジン存在下では、非存在下の場合に比べて、明らかな転写誘導時期の遅れが認められた。これらの結果から、少なくとも、*S. livdans* の *chiA* に関しては、直接的な誘導物質は、キトビオースであることが示された。さらに、*S. coelicolor* の有する 7 つのキチナーゼ遺伝子のうち、コロイダルキチンの存在下で同時期に転写が誘導された 5 つの遺伝子は、キトビオースによっても転写が誘導されたことから<sup>38)</sup>、これらの遺伝子の直接的な転写誘導物質はキトビオースであることが考えられる。

以上のように、*Streptomyces* 属放線菌のキチナーゼ遺伝子の発現制御には、プロモーター領域に存在する共通の繰り返し様配列が重要であることが示され、また、キチナーゼ遺伝子の直接的な誘導物質はキトビオースであることが判明した。しかし、キトビオースの認識からキチナーゼ遺伝子

の発現誘導に至るシグナル伝達の経路や、グルコース抑制のメカニズムについては、全く不明である。これらの遺伝子発現制御機構を解明することを目的とし、紫外線照射によって、*S. lividans* のキチナーゼ生産変異株の取得を行った。その結果、キチナーゼ生産のグルコース抑制が完全に解除された変異株 G015 を取得した。G015 株は、キチナーゼ遺伝子の転写のレベルでグルコース抑制が解除されていた。また、親株と異なり、グルコース資化能が欠損、グルコースのアナログである2-デオキシグルコースに耐性であることから、グルコースキナーゼ遺伝子 (*glkA*) の変異株であることが推定された。そこで、G015 株に低コピー数のプラスミドベクターを用いて、*S. coelicolor* の *glkA* を導入したところ、*glkA* によって、グルコース資化性、2-デオキシグルコース感受性、およびグルコースキナーゼ活性が相補されるとともに、G015 株におけるキチナーゼ生産のグルコース抑制が相補された (Fig. 5)。これらのことから、*S. lividans* のキチナーゼ遺伝子発現におけるグルコース抑制には、*glkA* が関与することが示された<sup>44)</sup>。

以上のように、*Streptomyces* 属放線菌は多様なキチナーゼ遺伝子を有すること、それらの遺伝子の発現制御には、プロモーター領域に存在する繰り返し様配列と *glkA* 遺伝子が関与すること、また、キチナーゼ遺伝子の発現の直接の誘導物質はキトビオースであることを明らかにしてきた。今後

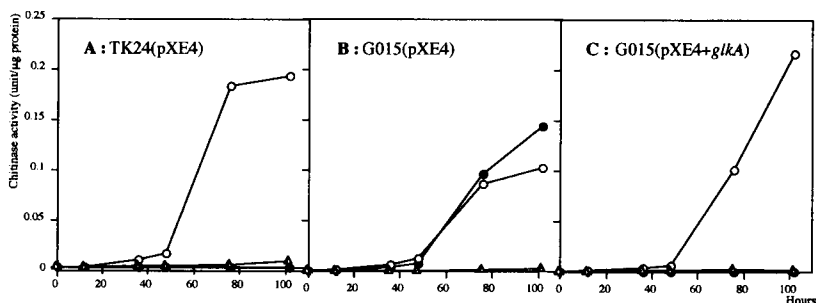


Fig. 5. *Streptomyces lividans* のキチンとグルコースの存在下でのキチナーゼ生産<sup>44)</sup>。A, 親株 TK24 に低コピー数のプラスミドベクター pXE4 を導入した株; B, 変異株 G015 に pXE4 を導入した株; C, G015 に pXE4 を用いて *glkA* 遺伝子を導入した株 (キチンもグルコースも含まない); ○, 基礎培地にコロイド状キチンを添加; ●, 基礎培地にコロイド状キチンとともにグルコースを添加。

は、キチン分解において多様なキチナーゼを生産することの意義、ならびに、キチナーゼ遺伝子の発現制御機構の全貌を明らかにしていきたいと考えている。これらは、*Streptomyces* 属放線菌という代表的な土壤細菌の生存戦略を分子レベルで理解するうえで一つのモデルになると考えられる。

## 参考文献

- 1) Schlumbaum, A., Mauch, F., Vögeli, U. and Boller, T. (1986) *Nature* 324: 365-367
- 2) Mauch, F., Mauch-Mani, B. and Boller, T. (1988) *Plant Physiol.* 88: 936-942
- 3) Leah, R., Tommerup, H., Svendsen, I. and Mundy, J. (1991) *J. Biol. Chem.* 266: 1564-1573
- 4) Salzer, P., Hübner, B., Sirrenberg, A. and Hager, A. (1997) *Plant Physiol.* 114: 957-968
- 5) Boot, R.G., Renkema, G.H., Strijland, A., van Zonneveld, A.J. and Aerts, J.M. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 26252-26256
- 6) Henrissat, B. (1991) *Biochem. J.* 280: 309-316
- 7) Henrissat, B. and Bairoch, A. (1993) *Biochem. J.* 293: 781-788
- 8) Davies, G. and Henrissat, B. (1995) *Structure* 3: 853-859
- 9) Armand, S., Tomita, H., Heyraud, C., Gey, C., Watanabe, T. and Henrissat, B. (1994) *FEBS Lett.* 343: 177-180
- 10) Iseli, B., Armand, S., Boller, T., Neuhaus, J.-M. and Henrissat, B. (1996) *FEBS Lett.* 383: 186-188
- 11) Ohno, T., Armand, S., Hata, T., Nikaidou, N., Henrissat, B., Mitsutomi, M. and Watanabe, T. (1996) *J. Bacteriol.* 178: 5065-5070
- 12) Watanabe, T., Kobori, K., Miyashita, K., Fujii, T., Sakai, H., Uchida, M. and Tanaka, H. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 18567-18572
- 13) Linthorst, H.J.M. (1991) *Crit. Rev. Plant Sci.* 10: 123-150
- 14) Meins, F.J., Neuhaus, J.M., Sperisen, C. and Ryals, J. (1992) The primary structure of plant pathogenesis related glucanohydrolases and their genes, Springer, Vienna
- 15) Broglie, K., Chet, I., Holliday, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvais, C. J. and Broglie, R. (1991) *Science* 254: 1194-1197
- 16) Vierheilig, H., Alt, M., Neuhaus, J. M., Boller, T. and Wiemken, A. (1993) *Mol. Plant Microbe Interact.* 6: 261-264
- 17) Kurosaki, F., Tachiro, N. and Nishi, A. (1988) *Plant Cell Physiol.* 29: 527-531
- 18) Ride, J.P. and Barber, M.S. (1990) *Plant Sci.* 71: 185-197

- 19) Schickler, H. and Chet, I. (1997) *Microbiol. Biotechnol.* 19 : 196-201
- 20) Salzer, P., Hebe, G., Reith, A., Zitterell-Haid, B., Strasky, H., Gaschler, K. and Hager, A. (1996) *Planta* 198 : 118-126
- 21) Albrecht, C., Burgess, T., Dell, B. and Lapeyrie, F. (1994) *New Phytol.* 127 : 217-222
- 22) Mitchell, R. and Alexander, M. (1962) *Proc. Soil Sci. Soc. America* 26 : 556-558
- 23) Sneh, B., Katan, J. and Henis, Y. (1971) *Phytopathology* 63 : 1113-1117
- 24) Lloyd, A.B., Noverske, R.L. and Lockwood, J.L. (1965) *Phytopathology* 55 : 871-875
- 25) Skujins, J.J., Potgieter, H.J. and Alexander, M. (1965) *Arch. Biochem. Biophys.* 111 : 358-364
- 26) Berger, L.R. and Reynolds, D.M. (1958) *Biochim. Biophys. Acta* 29 : 522-534
- 27) Skujins, J., Pukite, A. and McLaren, A.D. (1970) *Enzymologia* 39 : 353-370
- 28) Tominaga, Y. and Tsujisaka, Y. (1976) *Agr. Biol. Chem.* 40 : 2325-2333
- 29) Romaguera, A., Menge, U., Breves, R. and Diekmann, H. (1992) *J. Bacteriol.* 174 : 3450-3454
- 30) Miyashita, K. and Fujii, T. (1993) *Biosci. Biotech. Biochem.* 57 : 1691-1698
- 31) Fujii, T. and Miyashita, K. (1993) *J. Gen. Microbiol.* 139 : 677-686
- 32) Miyashita, K., Fujii, T., Watanabe, A. and Ueno, H. (1997) *J. Ferm. Bioengin.* 83 : 26-31
- 33) Robbins, P.W., Oberbye, K., Albright, C., Benfield, B. and Pero, J. (1992) *Gene* 111 : 69-76
- 34) Tsujibo, H., Endo, H., Minoura, K., Miyamoto, K. and Inamori, Y. (1993) *Gene* 134 : 113-117
- 35) Blaak, H., Schnellmann, J., Walter, S., Henrissat, B. and Schrempf, H. (1993) *Eur. J. Biochem.* 214 : 659-669
- 36) Redenbach, M., Kieser, H.M., Denapaite, D., Eicher, A., Cullum, J., Kinashi, H. and Hopwood, D.A. (1996) *Mol. Microbiol.* 21 : 77-96
- 37) Saito, A., Fujii, T., Yoneyama, T., Redenbach, M., Ohno, T., Watanabe, T. and Miyashita, K. (1999) *Biosci. Biotech. Biochem.* 63 : 710-718
- 38) 齋藤明広 (1998 年度) 筑波大学大学院農学研究科学学位論文
- 39) Neugebauer, E., Gamache, B., Déry, C.V. and Brzezinski, R. (1991) *Arch. Microbiol.* 156 : 192-197
- 40) Miyashita, K., Fujii, T. and Sawada, Y. (1991) *J. Gen. Microbiol.* 137 : 2065-2072
- 41) Delic, I., Robbins, P. and Westpheling, J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.*



USA. 89: 1885-1889

- 42) Ni, X. and Westpheling, J. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 13116-13121
- 43) 宮下清貴, 藤井 毅, 梶原敏子 (1997) 日本農芸化学会 1997 年度大会講演要旨集: 207
- 44) Saito, A., Fujii, T., Yoneyama, T. and Miyashita, K. (1998) J. Bacteriol. 180: 2911-2914



# 熱帯 *Bradyrhizobium* 属根粒菌の 遺伝的多様性

横山 正<sup>1)3)</sup>・安藤象太郎<sup>2)</sup>・友岡 憲彦<sup>1)</sup>  
Duncan A. Vaughan<sup>1)</sup>・土屋 健一<sup>1)</sup>

---

## はじめに

*Bradyrhizobium* 属根粒菌は *B. japonicum* や *B. elkanii* を除き、種や biovar は記載されていない。Jordan (1984) は *Bradyrhizobium* 属根粒菌は非常に多様性に富んだ nodulating bacteria であり、未だ、属内の分類体系が十分に解明されておらず、*Bradyrhizobium* 属根粒菌に関する分類情報が蓄積すれば、多数の種や biovar が記載されるであろうと指摘した。

*Bradyrhizobium* 属根粒菌の宿主植物としては *Glycine* 属、*Vigna* 属、*Macroptilium* 属、*Lotus* 属、*Acacia* 属等が記載されている (Jordan 1984)。近年、*Aeschynomene* (So *et al.* 1994), *Acacia albida* (Dupuy *et al.* 1994), *Lupinus* (Bottomley *et al.* 1994), *Centrosema* and *Desmodium* (Gao *et al.* 1994; Graham *et al.* 1995) 等から分離された根粒菌の研究は、*Bradyrhizobium* 属根粒菌に *B. japonicum* や *B. elkanii* 以外の種が存在することを示唆している。

私共は、熱帯地域に新しく導入されつつあるダイズに根粒を形成する熱帯固有なダイズ根粒菌 (*Bradyrhizobium* 属根粒菌) の遺伝的特質を明らかにすること及び、熱帯 *Bradyrhizobium* 属根粒菌とマメ科植物の共生機構を解明することを目的に研究を行ってきた。本論文においては、まず、私共が温帯と熱帯のダイズ根粒菌で見いだしてきた遺伝的な特性の違いを述

---

<sup>1)</sup>農業生物資源研究所, <sup>2)</sup>国際農林水産業研究センター

<sup>3)</sup>東京農工大学

べ、次に、タイのダイズ根粒菌とタイ国各地の *Vigna* 属植物から採取した *Bradyrhizobium* 属根粒菌間の遺伝的多様性及び系統関係を検討する。

## 材料及び方法

1) タイ国でのダイズ根粒菌の採取：1998年にタイ国11ヶ所のダイズ畑から根粒と土壌の採取を行い、さらに、根粒菌センターでそれら採取した根粒よりダイズ根粒菌を分離し、日本へ持ち帰った。

2) タイに自生する *Vigna* 属アズキ亜属野生植物 (The subgenus *Ceratotropis* in the genus *Vigna*) からの根粒菌の収集：タイにはアズキやリョクトウに近縁なササゲ属アズキ亜属に属する野生種が分布しており、これらの野生種に着生している根粒菌の遺伝的特性を解明する材料を得るため、JIRCAS タイ事務所、スラナリ工科大学およびチャイナート畑作研究センターの協力を得てタイ北部で、アズキ亜属野生種の根粒を収集した。また、対照として、野生種の採取地点の近傍の畑より *V. radiata* の根粒を採取した。

図1に示した58の収集地点で、アズキ亜属野生種では *Vigna grandiflora* 2点、*V. hirtella* を含むと思われる未同定種 (*Vigna* sp.) 18点、*V. minima* 3点、*V. mungo* var. *silvestris* 1点、*V. trinervia* 3点、*V. umbellata* (野生種) 35点から根粒と完熟種子が得られた場合は種子をあわせて収集した。その他比較のために、近縁の栽培種であるリョクトウ (*V. radiata*) 2点、ケツルアズキ (*V. mungo*) 4点、ツルアズキ (*V. umbellata*) 6点、ジュウロクササゲ (*V. unguiculata* cv-gr. *Sesquipedalis*) 2点、ササゲ (*V. unguiculata* cv-gr. *Unguiculata*) 2点、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) 1点から根粒と可能な場合は種子を収集した。今回実験に用いた根粒菌は *Vigna* 属野生種6種 (*V. hirtella*, *V. minima*, *V. mungo*, *V. grandiflora*, *V. umbellata*, *V. trinervia*) 及び栽培種2種 (*V. umbellata*, *V. radiata*) の根粒より分離したものである。

3) 根粒菌のRFLP解析：根粒菌の接種歴が無いタイのダイズ畑の土壌より分離した63株 (TARC)、*Vigna* 属野生種より分離した55株 (TW)、日本各地の土壌より分離した46株 (NIAES)、米国農務省で保存

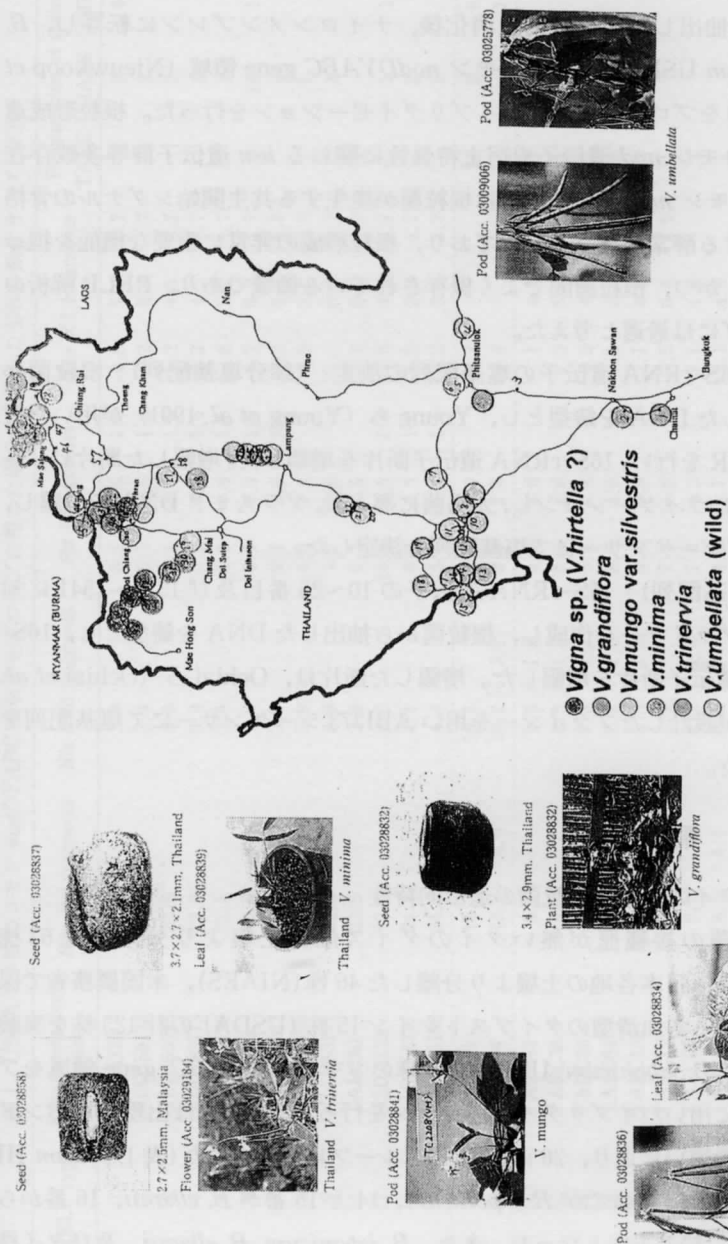


図1 探索経路と収集地点 (Route and collection sites)

している各血清型のタイプストレイン 15 株 (USDA) の計 178 株から DNA を抽出し、制限酵素で消化後、ナイロンメンブレンに転写し、*B. japonicum* USDA 110 株のコモン *nodDYABC* gene 領域 (Nieuwkoop *et al.* 1987) をプローブに用いハイブリダイゼーションを行った。根粒形成遺伝子はコモン *nod* 遺伝子や宿主特異性に関わる *hsn* 遺伝子群等多数存在する。コモン *nod* 遺伝子領域は根粒菌が産生する共生開始シグナルの骨格を合成する酵素群をコードしており、根粒形成の非常に重要な機能を担っている。かつ、根粒菌間でよく保存されている領域であり、RFLP 解析のプローブには最適と考えた。

4) 16S-rRNA 遺伝子の塩基配列の決定：(部分塩基配列)：根粒菌から抽出した DNA を鋳型とし、Young ら (Young *et al.* 1991) が用いた方法で PCR を行い、16S-rRNA 遺伝子断片を増幅した。増幅した断片は、T-Vector にライゲーションし、大腸菌に導入後、プラスミド DNA を分離し、ABI373 シーケンサーにて塩基配列を決定した。

(全塩基配列)：16S-rRNA 遺伝子の 10～25 番目及び 1525～1541 に対応するプライマーを作成し、根粒菌から抽出した DNA を鋳型とし、16S-rRNA 遺伝子断片を増幅した。増幅した断片は、Ochiai ら (Ochiai *et al.* 1999) が設計したプライマーを用い ABI373 シーケンサーにて塩基配列を決定した。

## 結 果

### 1) タイのダイズ根粒菌の遺伝的特性

根粒菌の接種歴が無いタイのダイズ畑の土壌より分離した 63 株 (TARC)、日本各地の土壌より分離した 46 株 (NIAES)、米国農務省で保存している各血清型のタイプストレイン 15 株 (USDA) の計 123 株を実験に供し、*B. japonicum* USDA 110 株のコモン *nodDABC* gene 領域をプローブに用いハイブリダイゼーションを行った。123 株は出現したバンドサイズの違いにより、26 の RFLP グループに分類された (表 1)。*Bam* HI の場合、13 番までが *B. japonicum*、14 と 15 番が *B. elkanii*、16 番から 26 番までがタイ株となった。また、*B. japonicum*、*B. elkanii*、及びタイ株

表1 USDA 110株のコモモン *nodD*YABC 遺伝子をプローブに用いた場合に出現した DNA 断片サイズ (Kb)

RELp type	Representative strain	Bam H I fragments	Hin d III fragments	Pst I fragments	Eco R I fragments	Frequencies of stains					
						TARC	NIAES	USDA			
1	USDA122	22.5	3.9	5.1	4.5	1.6	5.8	5.2	1.7	9	6
2	NIAES3124	22.5	3.9	5.1	4.5	1.6	5.2	5.0	1.7	3	
3	NIAES3135	22.5	3.9	5.1	4.5	1.6	5.2	4.5	1.7	2	
4	NIAES3173	22.5	3.9	5.1	4.5	1.6	9.2	4.5	1.7	1	
5	NIAES3190	22.5	3.9	5.1	4.5	1.6	15.6	5.2	1.7	1	
6	USDA110	22.5	3.9	5.1	4.5	1.6	9.2	5.2	1.7	14	1
7	NIAES3143	22.5	3.9	9.1	5.6	1.6	9.2	5.2	1.7	1	
8	NIAES3150	22.5	3.9	4.5	1.6		6.9	5.2	1.7	1	
9	NIAES3191	22.5	3.9	4.5	1.6		9.2	6.9	1.7	1	
10	TARC80	22.5	3.9	5.3	1.6		7.1	6.2	1.7	1	
11	USDA123	22.5	3.9	14.9	4.5	1.6	5.8	4.0	1.7	1	1
12	NIAES3131	24.2	4.4	6.0	4.5	1.6	6.5	3.7	1.7	2	
13	NIAES3132	24.2	4.4	5.1	4.5	1.6	10.2	5.9	1.7	1	
14	USDA31	13.3	6.6	3.0	2.0		12.4			24	9
15	USDA94	13.3	6.6	3.0	2.0		12.4			1	
16	TARC64	9.3	2.3	1.8	4.9	4.6	7.1	4.8		13	
17	TARC38	9.3	2.3	1.8	5.4	4.6	7.5	5.4		1	
18	TARC28	9.3	2.3	1.8	5.4	4.1	9.5	4.8		1	
19	TARC84	9.3	2.3	1.8	8.6	4.6	7.1	4.8		8	
20	TARC156	9.3	2.3	1.8	6.4	4.9	7.1	4.8		1	
21	TARC79	9.3	3.9		7.1	4.8	7.5	6.4	1.9	1	
22	TARC86	9.1	2.3	1.8	7.0	4.2	7.1	4.8		4	
23	TARC42	4.5	4.0		4.6	3.7	7.1	4.8		1	
24	TARC142	4.5	4.0		4.6	3.9	7.1	4.8		1	
25	TARC113	6.5	4.0		4.8	2.6	14.1	3.8		1	
26	TARC104	6.5	4.0		7.0	4.2	7.1	4.8		5	

間では、優占的に出現する RFLP パターンが存在することが分かった。これらのデータのクラスター解析を行い系統樹を作成した (図 2 Yokoyama *et al.* 1996)。

コモン *nod* gene の違いに基づき、実験に用いた 123 株は 4 つのクラスターに区別された。系統 1 は、1 株のタイ株を除いて、全て、*B. japonicum* で占められた。系統 2 には USDA 株や日本の NIAES 株で *B. elkanii* に分類されるものが集まった。また、この系統には 24 株のタイ株が含まれたが、これらの株は USDA 31 株の抗血清と強く反応することから serogroup 31 に属する菌群と考えられ、*B. elkanii* であると推定された (Yokoyama *et al.* 1999)。これらのことより、系統 2 は、*B. elkanii* で占められていること

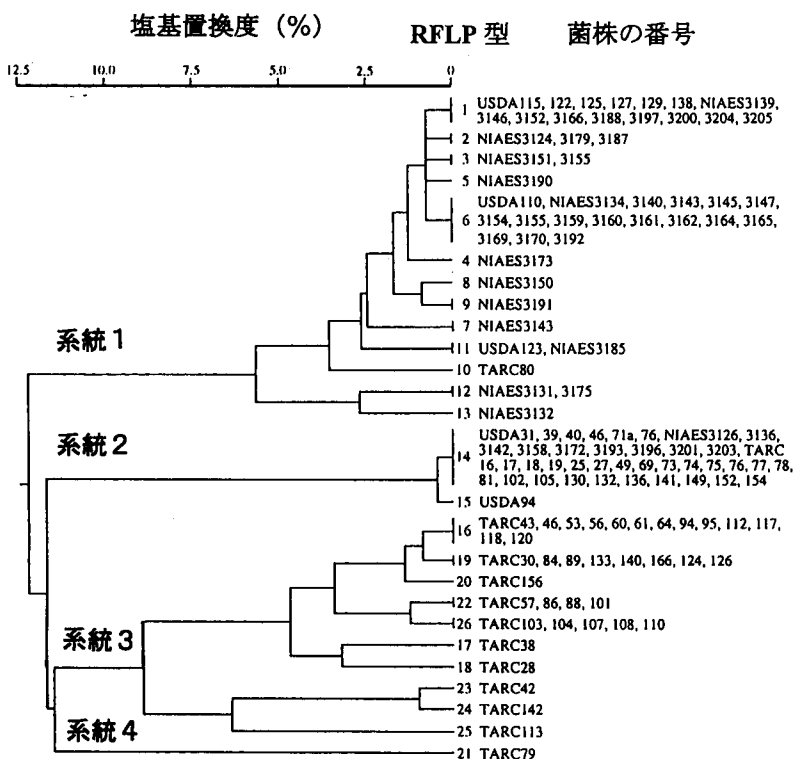


図 2 26 種の RFLP タイプに属する 123 株のダイズ根粒菌の遺伝的類縁関係



が分かった。系統 3 及び 4 はタイ株のみで占められた。また、各クラスター間に共通したバンドが全く出現しなかったため、互いの類似度は計算上は 0% となり、各系統間に極めて大きな遺伝的なギャップが存在することが推定された。

## 2) 16S-rRNA 遺伝子の部分塩基配列の決定に基づくタイのダイズ根粒菌の系統

図 2 の系統樹により、クラスター 1 には、*B. japonicum* が、クラスター 2 には *B. elkanii* が、また、クラスター 3, 4 にはタイ株がそれぞれ区分された。これらの結果より、タイで分離したダイズ根粒菌は *B. japonicum* や *B. elkanii* とは異なるダイズ根粒菌の一群であることが推定された。そこで、次に、タイ株と他の 2 種の系統関係を類推するため、それぞれの株の 16S-rRNA の部分塩基配列を決定し、比較した。根粒菌の 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列（約 1500 塩基ある 16S rRNA 遺伝子の前の方 264 塩基）の比較は、Young ら (Young *et al.* 1991) が最初に用い、現在では *Rhizobium* 属根粒菌でも、*Bradyrhizobium* 属根粒菌でも、多くの根粒菌でこの領域の塩基配列が決定されており、そのため、この領域の塩基配列を決定すれば、既存のデータと照らし合わせることが可能である。PCR によつて増幅したタイの 7 株 (TARC 64, 84, 124, 156, 86, 38, 113) 及び USDA の 11 株 (USDA 62, 125, 129, 139, 122, 115, 6, 31, なお、*B. japonicum* の USDA 110, 123 及び *B. elkanii* の USDA 76, 94 の塩基配列は既に報告されていた。) の 264 塩基を比較したところ、タイのダイズ根粒菌 7 株の塩基配列はすべて一致した。一方、*B. japonicum* の USDA 株の内、USDA 110, 62, 125, 138, 122, 123 はタイ株とは 5 塩基異なる塩基配列を持っていた。一方、残りの USDA 6, 115, 129 はタイ株と同じ塩基配列であった。また、*B. elkanii* USDA 31, 76, 94 は同一の塩基配列を持っており、タイ株とは 6 塩基異なっていた (Ando *et al.* 1999)。*B. japonicum* と *B. elkanii* は、16S rRNA 遺伝子の部分配列 264 塩基中、11 塩基が異なっていたが、タイの根粒菌は *B. japonicum* USDA 110 株から 5 塩基、*B. elkanii* USDA 94 から 6 塩基異なり、*B. japonicum* と *B. elkanii* の中間に位置する配列を持っていた。

これらの結果と、データベースから検索した *Bradyrhizobium* のシーク



を含む東北アジアであり、東南アジアには *Glycine* 属の野生植物は分布しておらず (パプアニューギニア・南太平洋諸島・オーストラリアに多年性の *Glycine* 属野生種が分布している。Duncan A. Vaughan 博士からの私信), *Vigna* 属マメ科植物は多数分布している (Tateishi 1985; Tomooka *et al.* 1991)。*Bradyrhizobium* は *Vigna* 属植物に根粒を形成するので (Jordan 1984), タイのダイズ菌は熱帯の *Vigna* 属にオリジナルホストの起源を持つ可能性がある。そこで、これらタイ固有種の起源をさぐるため、タイに分布している *Vigna* 属アズキ亜属に属するマメ科野生種より根粒を採取し、それら分離菌の根粒形成遺伝子の構造を比較した。

コモン *nodDYABC* 領域をプローブに用いた場合、試験した 55 株は各制限酵素処理により出現したフラグメントサイズパターンの違いにより、38 グループに分けられた。ついで、Upholt の方法 (Upholt 1977) により、55 株総当たりのコモン *nodDYABC* サイト当たりの塩基置換%の推定表を作り、クラスター分析を行い、系統樹を作成した (図 4)。55 株は大きく分けて 3 つのクラスター、つまりクラスター 1 からクラスター 3 に分類された。栽培種の *V. umbellata* と野生種の *V. trinervia*, *V. grandiflora*, *V. umbellata* に根粒を形成する根粒菌がクラスター 1 を形成した。また、栽培種の *V. radiata* と野生種の *V. minima* に根粒を形成する根粒菌でクラスター 2 が形成され、野生種の *V. hirtella* と *V. mungo* に根粒を形成する根粒菌がクラスター 3 を形成した。また、各クラスター内のサブクラスターを形成する菌群は大部分同一ホストの菌で構成されており、各野生種ごとに固有の根粒形成遺伝子をもつ根粒菌が共生系を形成していることが示唆された。

#### 4) タイで *Vigna* 属野生種に根粒を形成する根粒菌とダイズに根粒を形成する菌の遺伝的な比較

タイのダイズ根粒菌の優占種であるタイ固有ダイズ菌の起源をさぐるため、タイに分布している *Vigna* 属アズキ亜属に属するマメ科野生種の根粒より分離した根粒菌 55 株とダイズに根粒を形成する根粒菌 16 株を、コモン *nodDYABC* 領域をプローブに用いた RFLP 解析により比較した。

試験した 71 株は各制限酵素処理により出現したフラグメントサイズパ

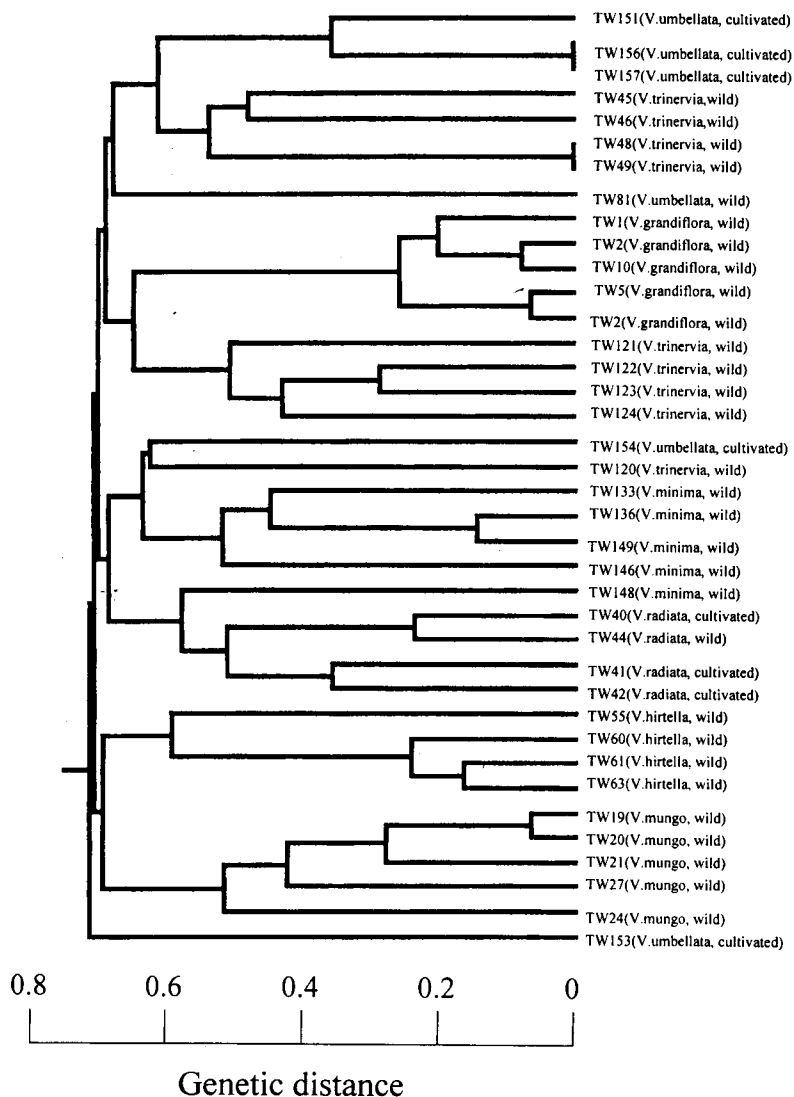


図4 *Vigna* 属近縁野生種に着生した根粒より分離された根粒菌の遺伝的類縁関係

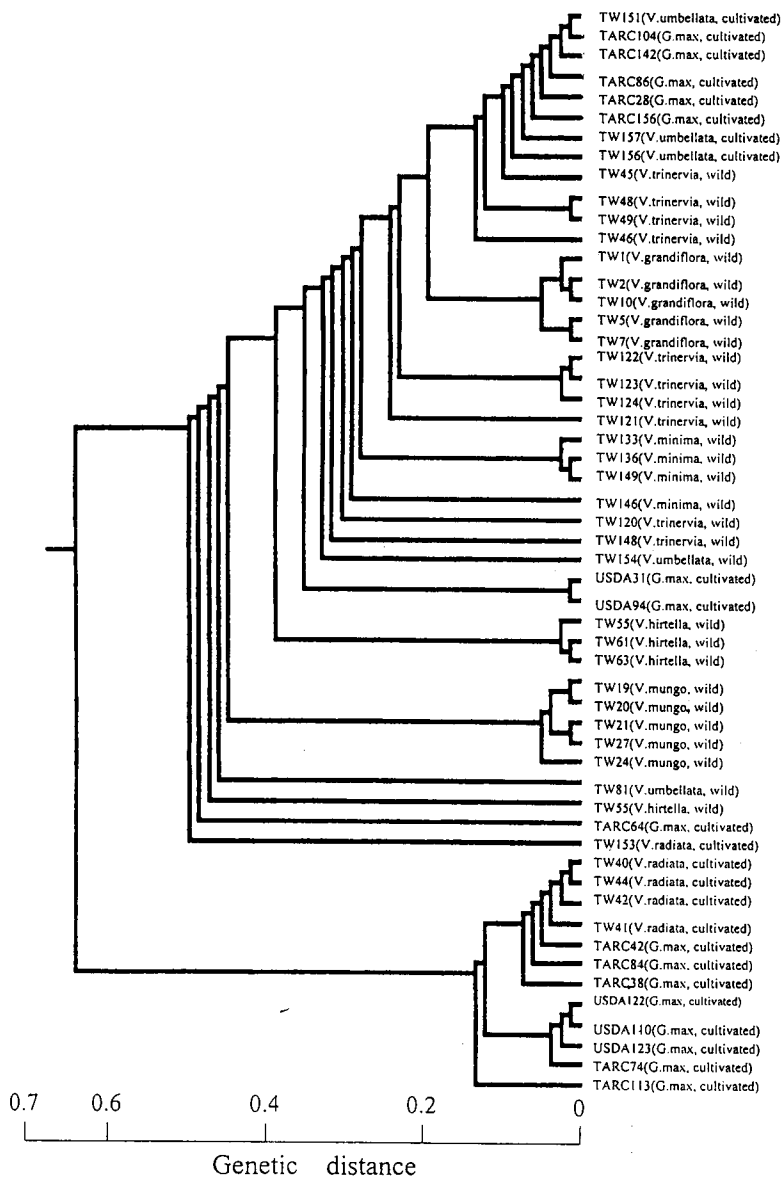


図5 *Vigna* 属と *Glycine* 属マメ科植物より分離された根粒菌の遺伝的類縁関係

ターンの違いにより、54 グループに分けられた(表 1)。ついで、Upholt の方法 (Upholt 1977) により、71 株総当たりのコモン *nodDYABC* サイト当たりの塩基置換%の推定表を作り、クラスター分析を行い、系統樹を作成した(図 5)。

71 株は大きく分けて 2 つのクラスターに分類された。栽培種の *V. radiata* 及び全ての *B. japonicum* と試験に用いた 11 株のタイのダイズ固有種中 5 株がクラスター 1 を形成した。また、残りの株でクラスター 2 が形成された。クラスター 2 は *Vigna* 属野生種から分離された全根粒菌及び全ての *B. elkanii* 種及び 6 株のタイのダイズ固有種で構成された。クラスター 1 とクラスター 2 の間には非常に大きな遺伝的なギャップの存在が示された。

熱帯の優占種のひとつである *B. elkanii* 種や一部のタイ固有ダイズ菌は今回分析した *Vigna* 菌と遺伝的に類縁関係を示すことが明らかになり、タイのダイズに着生する根粒菌の一部は、これら *Vigna* 属野生種に起源を持つことが分かった。また、クラスター 1 を構成するマングビーンやダイズから分離された菌群と温帯種の *B. japonicum* 種は、*Vigna* 属野生種に根粒を形成する菌群とは極めて大きな遺伝的ギャップを保持していることが分かった。

今回はデータを記載していないが、各菌株間の系統関係を推定するため、16S-rRNA 遺伝子の全塩基配列を解析し、系統樹を作成した。その結果、各 *Vigna* 属植物に根粒を形成する菌はクラスター内に、それぞれ独自の位置を占めており、*B. japonicum* や *B. elkanii* とは異なる系統の菌群であることが分かった。また、タイの栽培ダイズ及びマングビーンの根粒菌の系統とも異なっており、幾つかの種に分けられる可能性が示された。

## 考 察

熱帯で栽培されているダイズやマングビーンに根粒を形成し、分類学的位置づけが不明であった根粒菌は、熱帯固有種であり、温帯の菌とは根粒形成遺伝子や窒素固定遺伝子等の構造や遺伝的特性が大きく異なっていることが明らかになった。また、各系統間の 16S-rRNA の部分塩基配列の比

較により、タイの熱帯固有菌は、*B. japonicum* 種と *B. elkanii* 種の間位置する新系統の菌群であることが分かった。この結果は、これまで、温帯の菌を対象に研究してきた共生機構の研究や根粒菌の農業上の使用法の研究の成果が、熱帯菌と熱帯マメ科作物の共生機構の改善に直接適応できない場合が存在することを意味し、熱帯地域の根粒菌と熱帯マメ科作物の共生の改善には熱帯根粒菌を用いた独自の研究が必要であることが示唆された。

近縁野生種の根粒より分離した根粒菌の RFLP と栽培ダイズ及びマングビーンの根粒より分離した根粒菌の RFLP を比較する時点で、大部分の菌株は栽培種と野生種の両方に根粒を着生し、その結果、出現する RFLP パターンは類似しているのではないかと予想していた。一部の菌株は、予想どおり、栽培種と野生種の両方に根粒を形成していた。しかし、その他の菌株の RFLP パターンは、栽培種と野生種間でかなり異なっており、共通のバンドも少なく、栽培種で分類した系統とは異なる、幾つかの系統に分けられる可能性が出現した。現在までに、熱帯のダイズやマングビーンの栽培種に根粒を形成する *Bradyrhizobium* 属根粒菌の系統の一端は解明できたが、近縁野生種等まで宿主域を広げた場合、根粒形成遺伝子や窒素固定遺伝子及びその他の有用遺伝子の遺伝的多様性は全く未知数であることが分かってきた。熱帯の栽培植物に根粒を形成する熱帯根粒菌の分類体系は野生種に根粒を形成する巨大な熱帯根粒菌群の一部分に過ぎないことも予想され、栽培種と近縁野生種に着生する根粒菌の詳細な分子生物学的比較研究は、熱帯根粒菌の真の分類体系の確立のみならず、根粒菌と宿主植物の共進化の観点からも必要である。今後、*Vigna* 属マメ科作物の近縁野生種 (*V. grandiflora*, *V. umbellata*, *V. mungo*, *V. minima*, *V. trinervia*, *V. hirtella*) より採取した根粒菌の RFLP 解析・16S-rRNA 及び *gyrB* のシーケンス解析等により各分離菌株間の系統関係を明らかにするつもりである。

## 謝 辞

本研究は科学技術庁振興調整費「アジア地域の微生物研究ネットワークに関する研究」

予算により行った。ここに記して謝意を表します。

## 引用文献

- Ando, S. and Yokoyama, T. 1999: Phylogenetic Analysis of Thai soybean *Bradyrhizobium* Strains with reference to USDA Strains. *Can. J. Microbiol.* (1999 年 現在印刷中)
- Bottomley, P.J., Cheng, H.H. and Strain, S.R. 1994: Genetic structure and symbiotic characteristics of a *Bradyrhizobium* population recovered from a pasture soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1754-1761
- Dupuy, N., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Vandenbruaene, I., Maestrojuan, G., Dreyfus, B., Kersters, K., Collins, M.D. and Gillis, M. 1994: Phenotypic and genotypic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree, *Acacia albida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 461-473
- Gao, J.L., Sun, J.G., Li, Y., Wang, E.T. and Chen, W.X. 1994: Numerical taxonomy and DNA relatedness of tropical rhizobia isolated from Hainan province, China. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 151-158
- Graham, P.H., Sadowsky, M.J., Tighe, S.W., Thompson, J.A., Date, R.A., Howieson, J.G. and Thomas, R. 1995: Differences among strains of *Bradyrhizobium* in fatty acid-methyl ester analysis. *Can. J. Microbiol.*, **41**, 1038-1042
- Jordan, C.D. 1984: Family III. Rhizobiaceae. In "Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 1". Edited by Krieg, N.R. and Holt J.G. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md. 234-256
- Nieuwkoop, A.J., Banfalvi, Z., Deshmene, N., Gerhold, D., Schell, M.G., Sirotkin, K.M. and Stacey, G. 1987: A locus encoding host range is linked to the common nodulation genes of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **169**, 2631-2638
- Ochiai, H., Horino, O., Miyazaki, K. and Kaku, H. 1999: Pathogenicity and Genetic Relationships of *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* Strains from Sri Lanka. *Phytopathology* (1999 年 論文審査中)
- Tateishi, Y. 1985: A revision of the Azuki bean group, the subgenus *Ceratotropis* of the genus *Vigna* (Leguminosae). Ph. D. Thesis, Tohoku University, Sendai, Japan
- Tomooka, N. 1991: Collection and evaluation of wild *Ceratotropis* species in Northern Thailand. In "Genetic Diversity and Landrace Differentiation of Mungbean, *Vigna radiata* (L) Wilczek, and Evaluation of its Wild Relatives (The Subgenus *Ceratotropis*) as Breeding Materials" Technical Bulletin of Tropical Agriculture Research Center. No. 28. 39-46
- So, R.B., Ladha, J.K. and Young, J.P.W. 1994: Photosynthetic symbionts of



*Aeschynomene* spp form a cluster with bradyrhizobia on the basis of fatty acid and rRNA analyses. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44**, 392-403

Upholt, W.B. 1977 : Estimation of DNA sequence divergence from comparison of restriction endonuclease digests. *Nucleic Acids Res.* **4**, 1257-1265

Yokoyama, T., Ando, S., Murakami, T. and Imai, H. 1996 : Genetic variability of the common *nod* gene in soybean bradyrhizobia isolated in Thailand and Japan. *Can. J. Microbiol.*, **42**, 1209-1218

Yokoyama, T., Ando, S. and Tsuchiya, K. 1999 : Serological property and intrinsic antibiotic resistant of soybean bradyrhizobia isolated from Thailand., *Soil. Sci. Plant Nutr.*, (印刷中)

Young, J.P.W., Downer, H.L. and Eardly, B.D. 1991 : Phylogeny of the phototrophic *rhizobium* strain BTail by polymerase chain reaction-base sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.*, **173**, 2271-2277



# 土着ダイズ根粒菌の多様性と 遺伝子再編成

伊沢 剛・鮫島 玲子・南沢 究

土壌中には、マメ科植物の根に根粒を形成し、共生窒素固定を行う根粒菌と呼ばれる土壌細菌が生息している。窒素は植物体において、蛋白質、核酸、クロロフィル等の構成成分として必須な元素の一つとして知られているが、植物は空気中の無機態窒素を直接吸収利用することは出来ない。根粒菌は、無機態窒素を植物が利用可能な有機態窒素へ固定する能力を持ち、農業生産上に重要な役割を果たしている。しかし、現代の農業に於いてこれら窒素肥料の多くは、化学合成肥料として施用されている。化学合成肥料の製造が、また、余分に施用された肥料からの硝酸塩の河川への流入等が環境問題を引き起こしている。

そこでマメ科作物を栽培する際に特に能力の高い根粒菌を人工接種することが行われているが、もともと畑に生息している土着根粒菌が多く感染してしまうことが知られている。土着菌の競合力が強い原因を明らかにする一環として、我々は、畑のダイズ根粒菌の多様性を DNA を使った指紋法で調べた。その多様な菌株の中で、挿入配列 (Insertion Sequence, IS) を非常に多コピー保有するダイズ根粒菌が単離され、HRS 株と名づけた。HRS 株は DNA 再編成を起こした結果生成したと考えられ、本研究では再編成の様式と要因を解明する事、また、ある圃場に於いて HRS 株が高頻度に存在することから、HRS 株の生態的意義を解明することを目的として研究を行っている。

## 1. 土着ダイズ根粒菌の多様性

なぜ土着菌の競合力が強いのか明らかにするために、圃場より単離され

たダイズ根粒菌の遺伝的多様性を DNA を使ったフィンガープリント解析で調査した。日本各地 6 圃場、北海道十勝圃場、新潟県長倉圃場、中沢圃場、茨城県阿見圃場、広島県福山圃場、そして沖縄県石垣圃場より単離されたダイズ根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii*) 213 株に対し、ダイズ根粒菌 DNA 中に反復して存在し、挿入配列 (IS) と構造的に類似している配列 RS $\alpha$  と RS $\beta$ ) をプローブとしたフィンガープリントの解析を行った。その結果、ハイブリダイゼーションパターンの違いから土着ダイズ根粒菌は非常に多様であること、多様ではあるが圃場ごとにまとまったクラスターをなすこと、また、単離された圃場により多様性の度合いが異なることが観察された。検出された RS $\alpha$  と RS $\beta$  ハイブリダイゼーションバンドの優占度と多様性について検討したところ、ダイズ作付け歴のない圃場では優占度が高く、多様性は低いこと、逆に作付け歴のある圃場では優占度が低く多様性は高いという結果が示された。従って土着ダイズ根粒菌の多様性とダイズ作付け歴とは関係があることが示唆された<sup>2-5)</sup>。

## 2. HRS 株生成の作業仮説

単離された多様な菌株中で、新潟と十勝圃場からハイブリダイゼーションバンドを数えることが不可能なほど極めて多くの RS $\alpha$  と RS $\beta$  を持つ株が計 21 株単離された。これらを超反復配列保有株 (HRS 株: Highly Reiterated Sequence possessing isolate) と名づけた<sup>2-4,6,7)</sup>

HRS 株は、通常株と比較して ① RS $\alpha$  と RS $\beta$  のコピー数が極めて多いこと、② 窒素固定能、根粒形成能、ヒドロゲナーゼ活性は変わらないが、単生における生育速度がきわめて遅いこと、③ ニトロゲナーゼ、ヒドロゲナーゼなどの共生遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションの結果、バンドの移動や重複が観察されること、また、④ 通常株と HRS 株は各圃場に特有な同様の血清型パターンを示すことがわかった。これらの事実から「HRS 株は各圃場生態系内において挿入配列 (IS) の介在する DNA 再編成によって通常株から生成された」と考えられた。

そこで、本研究では「HRS 株は各圃場生態系内において挿入配列 (IS) の介在する DNA 再編成によって通常株から生成された」という説明を作

業仮説とし研究を行っている。この作業仮説をもとに、ダイズ根粒菌 HRS 株は、どのような DNA 再編成を起こした結果生成したか、また、圃場における現在の存在頻度の検討を行った。

### 3. 多種類の挿入配列 (IS) を多コピー保有する HRS 株

表 1 に示したように、大坪ら<sup>8)</sup>の逆方向反復配列単離法により、HRS 株から RS $\alpha$  と RS $\beta$  以外に既知の挿入配列 (IS) と相同性のある 5 種類の挿入配列 (IS) とその断片と思われる配列が単離された。これら挿入配列 (IS) をプローブに用いたサザンハイブリダイゼーションでは RS $\alpha$ , RS $\beta$  と同様に、単離されたすべての挿入配列 (IS) のコピー数が HRS 株で増加していた (図 1)。さらにその中の IS1631 は *B. japonicum* では HRS 株にのみ存在することが示唆された (図 1)。そこで、供試する圃場単離株の株数を増加し、同様にサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、やはり *B. japonicum* の HRS 株には必ず IS1631 が存在していた (図 2A, B)。また、図 2 の C の阿見圃場単離株に於いて RS $\alpha$ , RS $\beta$  コピー数から通常株であると考えた株にも IS1631 が存在していた。これらの株の RS $\alpha$  コピー数は、いくらか他の通常株より増加していることが観察される。従ってこれらの菌株は HRS 株に変化する途上の菌株ではないかと考えられた。

HRS 株のように挿入配列 (IS) を多コピー持つ細菌は好塩古細菌や、赤痢菌、酢酸生産菌など、何種類か知られている。約 500 コピーの挿入配列 (IS) を持つ酢酸生産菌は培養により酢酸生産能が失われるなど、不安定である<sup>9)</sup>。HRS 株においては、いままで、本研究室で調査された表現型については安定であると考えられる。また、HRS 株のように単離された少なくとも 7 種類の挿入配列 (IS) 全てのコピー数が増加しているものは知られていない。

### 4. IS1631 の構造的特徴

このように HRS 株にのみ存在する IS1631 の特徴を調べるために全塩基配列を決定した。その結果、IS1631 は全長 2,712 塩基で、逆方向または順方向の繰り返し配列が多数存在する末端逆方向繰り返し配列を持ち、ま

表 1 *B. japonicum* HRS 株より単離された挿入配列 (IS)

IS element	Length (kb)	TIR <sup>a</sup> (bp)	Source	Maximum homologous sequence <sup>b</sup> (Accession no.)	Percent of DNA Homology	IS family <sup>c</sup>
IS1631	2.7	41/53	T2	<i>Alcaligenes eutrophus</i> DR2 (D64144)	55.0%	IS21 (IS3)
IS1632	1.4	34/44	NK5	<i>Burkholderia cepacia</i> IS1413 (U58191)	60.0%	IS256
RS $\alpha$ (ISB12)	1.2	5/5	NK5	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> RSRj $\alpha$ 9 (M10925)	97.8%	IS630-Tc1
RS $\beta$ (ISB14B)	1.4	17/22	T2	<i>Shigella dysenteriae</i> IS911 (X17613)	57.5%	IS3
ISB20	2.0	22/26	T2	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> 123 HRS1 (L09226)	95.0%	—
ISB27B	2.7	17/23	NC3a	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> IS866 (M25805)	63.1%	—
FK1	0.8	—	NK5	<i>Pseudomonas cepacia</i> IS401 (U84154)	58.3%	IS21 (IS3)

<sup>a</sup> TIR, Terminal Inverted Repeat; 推定される TIR の塩基数を, 相同な塩基数/全体の塩基数, で示した。<sup>b</sup> DDBJ/EMBL/GenBank データベースで相同性検索の結果最も相同性の高いものを示してある。<sup>c</sup> 塩基配列の構造, トランスポゼーの推定アミノ酸配列の類似度により, 属すると推定される IS ファミリー。

た、トランスポゼースとヘルパープロテインの二つのオープンリーディングフレームを持っていた。以上の構造的特徴から、IS1631 はタンデム状態でレプリコン融合などの DNA 再編成の頻度が高まることが知られている。IS21 ファミリー<sup>10-12)</sup> に属する挿入配列 (IS) であることがわかった。

## 5. HRS 株の DNA 再編成

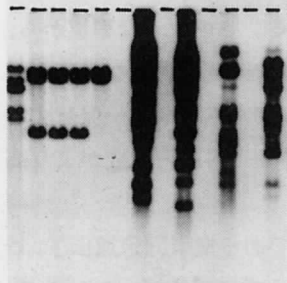
ところで、挿入配列 (IS) はほぼすべての生物に認められ、ある部位から他の部位へ転移できる可動遺伝因子群である。その転移によって遺伝子の制御因子の役割を持つ場合があることが知られている。挿入配列 (IS) を持つレプリコンでは欠失、逆位、レプリコン融合、解離など種々の挿入配列 (IS) の介在する DNA 再編成が引き起こされる。このような事実から、動く遺伝子が生物の進化に於いてゲノムの大規模な改変に大きな役割を果たしてきたと考えられている。挿入配列 (IS) を非常に多コピー保有する HRS 株では、このような挿入配列 (IS) の介在する DNA 再編成がより高い頻度で起こることが考えられた。

先にも少し触れたが HRS 株では、共生遺伝子である窒素固定遺伝子、ヒドロゲナーゼ遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションで、ハイブリダイゼーションバンドの移動や重複が観察された<sup>4,7)</sup>。したがって少なくともこれら遺伝子周辺では DNA 再編成が起こったことが示唆された。そこで新潟より単離された HRS 株の一つである NK6 株を用い、コスミドライブラリーを作製した。そして、窒素固定遺伝子、ヒドロゲナーゼ遺伝子領域のクローンを単離し、それら領域について物理地図を作製し詳細に検討を行った。図 3 と図 4 に示したように、どちらの領域でも、通常株と比較して、制限酵素切断部位が変化し、通常株では存在しない領域に両末端に標的配列をとまなう挿入配列 (IS) が存在していた。ヒドロゲナーゼ遺伝子領域は、ハイブリダイゼーションバンドの重複と一致して 2 領域単離され、一方には、構造遺伝子 *hupS*, *hupL* 間の intergenic region に *RSα* が挿入されていた。もう一方の領域では、欠失によると考えられるが、上流側の *hupP* 遺伝子が *hupU* のすぐ上流にあり、また領域の下流側は別の配列に切り替わっていた。窒素固定遺伝子領域では、*nifD*, *nifK*, *nifE*,

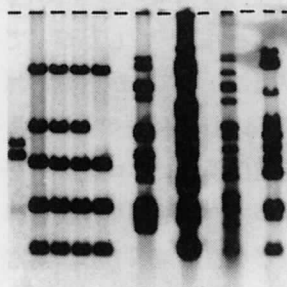
USDA76  
USDA110  
NC4a  
NK2  
T7  
NC3a #  
NK5 #  
T2 #  
USDA123 #



RS $\alpha$

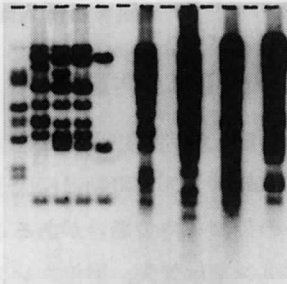


ISB27B

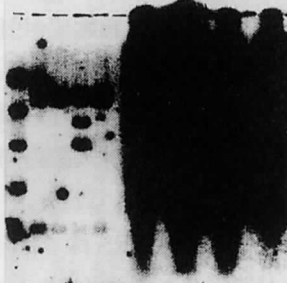


FK1

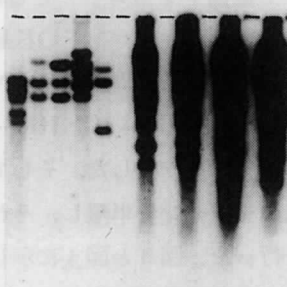
USDA76  
USDA110  
NC4a  
NK2  
T7  
NC3a #  
NK5 #  
T2 #  
USDA123 #



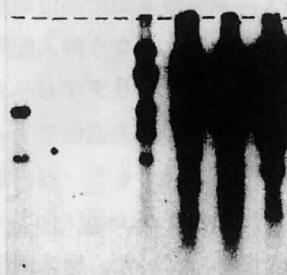
RS $\beta$



IS1632



ISB20



IS1631



*nifN* 領域は通常株と同様に保存されていたが *nifN* と *nifS* の間に挿入配列 (IS) の挿入が見られ、また、*nifS* の下流側は通常株とは異なる挿入配列 (IS) を含む領域であった。従ってこれら遺伝子領域で遺伝子重複、挿入配列 (IS) の挿入、欠失等、DNA 再編成の痕跡が観察された。以上から HRS 株が DNA 再編成によって生成したことがより示唆された。

## 6. 圃場における HRS 株の現在の存在頻度

1989 年に日本各地 6 圃場、北海道十勝、新潟県長倉、中沢、茨城県阿見、広島県福山、沖縄県石垣からダイズ根粒菌を単離した際、北海道の十勝農試、新潟県の新潟農試長倉圃場、中沢圃場からのみ HRS 株が単離された。長倉圃場に於いては単離株の 50% 以上が HRS 株であった。図 5 に示したように、DNA 再編成を起こすことは、根粒菌が根粒菌ではなくなる場合や死にいたる場合も考えられる。1989 年に単離された HRS 株は DNA 再編成を起こしたが、その時点でダイズ根粒菌のままで圃場に存在していた菌株である。現在の HRS 株の圃場における生存頻度を探ることは、HRS 株が土壌環境に適応し安定に土壌中に生存しているか、または不安定であるが DNA 再編成により圃場で生成され続けており、見かけ上土壌中に安定に生存しているように見えるのか、またはもう存在していないのか、HRS 株の生態を探る上で非常に重要であると考えた。そこで、1989 年にダイズ根粒菌を単離した際に、高頻度で HRS 株が単離された新潟農試長倉圃場における HRS 株の現在の存在頻度を検討した。

表 2 において、新潟農試の長倉圃場における 1989 年と 1997 年に単離されたダイズ根粒菌の割合を比較した。その結果、この圃場に於いて HRS 株は現在もほぼ同じ割合に存在していることが示唆された。このことは、HRS 株が安定に生存しているか、または通常株から DNA 再編成により生成され続けていることを示している。さらに、HRS 株は激しく DNA 再編

図 1 *B. japonicum* HRS 株より単離された挿入配列 (IS) をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション。

USDA76 は *B. elkanii*, USDA110, NC4a, NK2, T7 は *B. japonicum* 通常株, NC3a, NK5, T2, USDA123 は *B. japonicum* HRS 株。



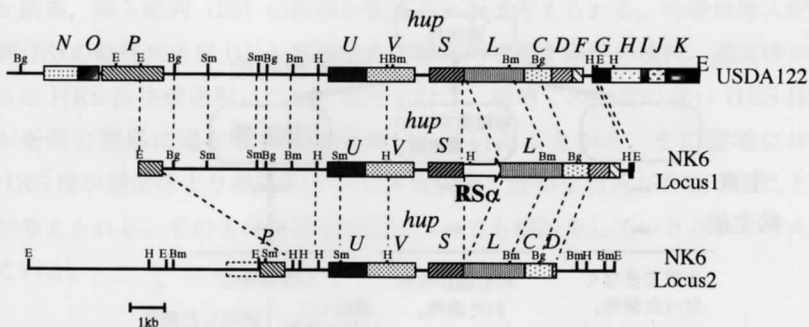


図3 *B. japonicum* 通常株 USDA122 と HRS 株 NK6 株のヒドロゲナーゼ遺伝子領域の比較。

E, *Eco*RI; H, *Hind* III; Bm, *Bam*H I; Bg, *Bgl* II; Sm, *Sma* I.

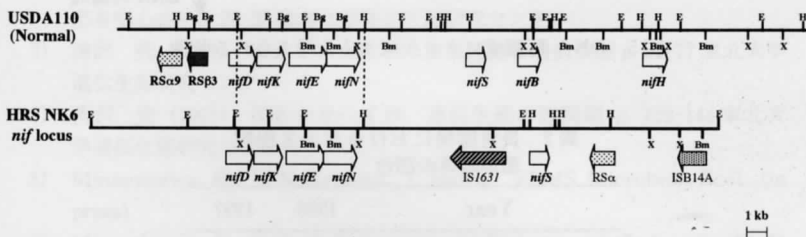


図4 *B. japonicum* 通常株 USDA110 と HRS 株 NK6 株の窒素固定遺伝子領域の比較。

E, *Eco*RI; H, *Hind* III; Bm, *Bam*H I; X, *Xho* I.

成を起こしているにもかかわらず、この土壤環境中で、少なくとも通常株と比較し不利になってはいないことを示している。長倉圃場は田畑輪換圃場であり、また、水田転換畑の鹿島台圃場に於いても HRS が単離されていることから HRS 株生成と水田環境に何らかの関連があることが考えられた。

挿入配列 (IS) を多数保有する HRS 株は、DNA 再編成に挿入配列 (IS)

図2 *B. japonicum* 圃場単離株に対する  $RS\alpha$ , IS1631 のサザンハイブリダイゼーション。

(#) は HRS 株を示している。A, 北海道十勝圃場単離株; B, 新潟県長倉圃場単離株; C, 茨城県阿見圃場単離株; D, 沖縄県石垣圃場単離株; E, 広島県福山圃場単離株。

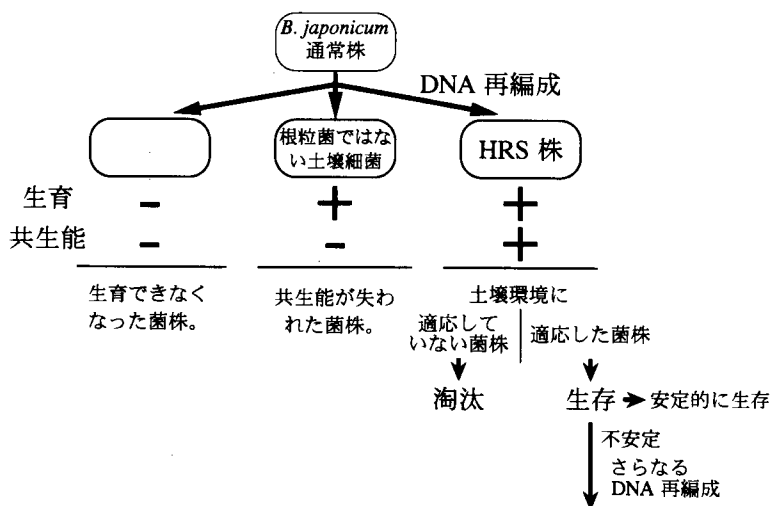


図5 DNA再編成により生成すると考えられる菌株。

表2 長倉圃場におけるダイズ根粒菌単離株の割合

Year	1989	1997
<i>B. japonicum</i> HRS	54%	57%
<i>B. japonicum</i> normal	46%	36%
<i>B. elkanii</i>	0%	6%
No. of tested isolates	26	171

エンレイの根粒より菌を単離し、IS1631とハイブリダイズするものをHRS株、インドール酢酸を生成するものを*B. elkanii*とした。

が関わっているように見える。再編成に於ける挿入配列 (IS) の介在等、様式について現在検討中である。しかし、挿入配列 IS1631 は *B. japonicum* HRS 株にのみ存在すること、全ての挿入配列 (IS) のコピー数が増加していることから再編成に挿入配列 (IS) が関与していることが示唆される。また、HRS 株内では7種類全ての挿入配列 (IS) のコピー数が増加していることから、HRS 株では菌株内の何らかの因子が破壊されたか不活化され

た結果、挿入配列 (IS) の転移が促進されたと考えられる。今後は挿入配列 (IS) の転移および DNA 再編成を実験室内で起す条件の検討、通常株からの HRS 株生成過程について検討を行う。培地での生育の遅い HRS 株が新潟の圃場に現在もなお多数存在していたことから、その圃場には HRS 株が通常株より単生あるいは共生状態で優勢な状況が存在することが考えられる。そのような環境要因についても検討をしていきたいと考えている。

## 参考文献

- 1) Kaluza, K., M. Hahn and H. Hennecke. (1985) J. Bacteriol. 162: 535-542.
- 2) 南沢 究 (1989) IGE シリーズ 14 微生物生態と分子生物の接点—環境適応を中心に—p. 29-35 東北大学遺伝生態研究センター
- 3) 南沢 究 (1994) IGE シリーズ 19 窒素固定の遺伝生態 p. 65-77 東北大学遺伝生態研究センター
- 4) 南沢 究 (1995) IGE シリーズ 20 遺伝生態の諸問題 p. 129-144 東北大学遺伝生態研究センター
- 5) Minamisawa, K., Y. Nakatsuka, T. Isawa. FEMS Microbiol. Ecol. (in press)
- 6) Minamisawa, K., T. Seki, S. Onodera, M. Kubota and T. Asami. (1992) Appl. Environ. Microbiol. 65: 2832-2839.
- 7) Minamisawa, K., T. Isawa, Y. Nakatsuka and N. Ichikawa. (1998) Appl. Environ. Microbiol. 65: 1845-1851.
- 8) Ohtsubo, H., and E. Ohtsubo. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73: 2316-2320.
- 9) Takemura, H., S. Horinouchi, and T. Beppu. (1991) J. Bacteriol. 173: 7070-7076.
- 10) Reimann, C. and D. Haas. (1987) Genetics 155: 619-625.
- 11) Reimann, C., M. Rella and D. Haas. (1988) J. Gen. Microbiol. 134: 1515-1523.
- 12) Reimann, C., R. Moore, S. Little, A. Savioz, N.S. Willetts, and D. Haas. (1989) Mol. Gen. Genet. 215: 416-424.



# *Pseudomonas syringae* 群細菌における病原性分化と適応進化

澤 田 宏 之

---

## はじめに

植物病原細菌である *Pseudomonas syringae* は遺伝的多様性に富んでいることが知られており、植物に対する病原性や宿主範囲という表現形質に基づいて、今のところ約 50 ほどの病原型 (pathovar) に細分されている<sup>1)</sup>。しかし、pathovar 類別の基準である病原性や宿主範囲の違いと、生理・生化学的性質や DNA 相同性との間には整合性の認められない場合があり、このことが *P. syringae* の病原性分化や多様性についての解析を困難にしていることが指摘されている<sup>1-3)</sup>。

植物病原細菌が植物に侵入・感染し、病気を引き起こすためには、植物との親和性に関与する因子や植物組織を破壊するための直接的な発病因子など様々な性質を合わせ持つ必要があり、そのために必要な遺伝子は膨大な数に上ると考えられている<sup>4)</sup>。したがって、*P. syringae* における複雑な病原性分化や多様性の本質を理解するためには、病原性という表現形質レベルだけではなく、その形質発現の基礎となっている遺伝子レベルでの多様性を丹念に明らかにしていくことが必要である。また、異なる pathovar が同じ植物種を侵したり、類似した病徴を示す現象があることから、病原性関連遺伝子が pathovar 間を水平移動し、共有されている可能性も疑わなければならないであろう。

病原細菌のゲノムは、このような病原性関連遺伝子が入り出すための

「遺伝子の乗り物」であると考えられることもできる。したがって、乗り物であるゲノムの進化の道筋を最初にはっきり把握しておけば、それを病原性関連遺伝子との比較のための「絶対的な基準」として利用することができるのではないだろうか。そこで、まず最初にゲノム進化の道筋を明らかにした後で、それぞれのゲノム上にいつどのような病原性関連遺伝子が生まれたのか、あるいは水平移動などによって導入されたのか、その後それらがどのように変異したのか、などについて順序立てて解析していくことを当面の目標として考え、以下に述べるような研究を開始したところである<sup>5-8)</sup>。

## 1. ゲノムの進化の道筋

ゲノムの分化の実態を把握するために、*gyrB* (DNA gyrase  $\beta$  サブユニット遺伝子)<sup>9)</sup> と *rpoD* (group 1  $\sigma^{70}$ -type sigma factor 遺伝子)<sup>10)</sup> という2つの protein-coding genes の配列を決定し、分子進化学的解析を試みた。次に、*P. syringae* に普遍的に存在し、病原性や宿主範囲の決定における基本的な過程に関与していると考えられているいわゆる“*hrp* gene cluster”<sup>11)</sup>の中から、*hrp/avr* 遺伝子群の発現制御に関わっていると考えられている *hrpL* と *hrpS* を病原性関連遺伝子の代表として選び、配列を決定した。そして、*gyrB* と *rpoD* に基づいて明らかにしたゲノム進化の道筋と、*hrpL* と *hrpS* に関するデータとを比較し、これら病原性関連遺伝子の進化機構を明らかにしていくことを最初の目標として考えた。また、代表的な菌株を選んでゲノムの物理地図を作製し、指標として選んだ各遺伝子を地図上にマッピングして比較することにより、進化の過程でゲノムの構造がどのように変化してきたのかを評価することも試みた。

### (1) 各遺伝子系統樹上に認められたグループの単系統性の確認

*P. syringae* に属する 21 pathovar (59 菌株) の配列データから重複を除いた 31 OTU のアラインメントを対象にして、近隣結合法(NJ法)、最大節約法(MP法)および最尤法(ML法)による系統樹作成とブートストラップ解析を行い、各遺伝子ごとに3つ、合計12個の遺伝子系統樹を得た(表1)。その結果、いずれの系統樹においても、グループ1(9 OTU)、グルー



表1 3つの系統樹作成法によって各遺伝子ごとに得られたトポロジー

指標として 用いた遺伝子	系統樹作成法	系統樹のトポロジー (グループの分岐順序)			ブートストラップ 確率 (%) <sup>a</sup>
		(3, (1, 2))	(2, (1, 3))	(1, (2, 3))	
<i>gyrB</i>	NJ			○	94.5
	ML			○	77.6
	MP			○	65.3
<i>rpoD</i>	NJ			○	69.8
	ML		○		72.8
	MP			○	73.0
<i>hrpL</i>	NJ			○	53.4
	ML		○		55.1
	MP		○		88.1
<i>hrpS</i>	NJ			○	54.0
	ML		○		51.6
	MP			○	55.4
concatenated sequence	NJ			○	86.9
	ML		○		67.0
	MP		○		60.9

<sup>a</sup> グループの分岐順序を決定している枝におけるブートストラップ確率を示す。

ブ2 (8 OTU), およびグループ3 (14 OTU) という3つのまとまりが共通して現れることが明らかとなった。グループのまとまりを示すブートストラップ確率はいずれも非常に高い値となること、各グループ内の同義置換距離の平均値は小さいのに対し、グループ間の平均値は大きな値となることから、いずれのグループも独立した単系統群として考えるべきであると判断した。

すなわち、*P. syringae* においてこれら4つの遺伝子は、いずれも進化の過程でそれぞれ3つのグループに分化してきたということがいえる。しかも、4つの遺伝子の間で、それぞれのグループを構成する OTU が互いに完全に一致していた。このことは、ここで用いた *P. syringae* では、これら4つの遺伝子は少なくともグループ間にまたがるような水平移動はしておらず、同一ゲノム上で同じ進化の道筋を経てきたことを示している。したがっ

て、病原性関連遺伝子として選んだ *hrpL* および *hrpS* と、その比較の基準として採用した *gyrB* および *rpoD* とを、わざわざ区別して対比させる必要はないと判断した。そこで以後は、これら4つの遺伝子を、ゲノム進化の道筋を明らかにするための指標としてすべて一括して利用することにする。

## (2) グループの分岐順序に関する検討

前項で得られた12個の遺伝子系統樹のトポロジーを整理してみると、3つのグループの分岐の順序に関して(3, (1, 2))を示すものはなかったものの、(2, (1, 3))と(1, (2, 3))が4:8の頻度で現れ、どちらであるかを特定することはできなかった(表1)。しかも、グループの分岐順序を決めている枝のブートストラップ確率は、*gyrB* に関するNJ法の結果(94.5%)を除けばすべて低い値となった。また、OTUごとに4つの遺伝子のデータを連結して1つにまとめたデータ(concatenated sequence)を作り、それをもとに3つの解析法を適用しても統一した結果は得られなかった。

そこで、4つの遺伝子のデータの性質を厳密に吟味し、それぞれのデータに適合したモデルとパラメータを選択したのち、最尤法を用いて総合的に評価するという方法(不均質モデル)<sup>12)</sup>を試みた。すなわち、塩基置換モデルとしてはHKY85 modelを採用し、コドンの3つの座位ごとに $\alpha/\beta$ 比、枝の長さ、対数尤度を最尤推定し、最後に4遺伝子のデータを総合評価したところ、(2, (1, 3))が最尤系統樹となることがわかった。一方、(3, (1, 2))は5%水準で棄却されることが認められた。(1, (2, 3))に関しては、ブートストラップ確率は9.9%と非常に低いものの、棄却されることはなかった。以上のことから、3グループ間の分岐順序については(2, (1, 3))の可能性が極めて高いものの、ここで扱ったデータだけでは(2, (1, 3))か(1, (2, 3))のどちらであるかについて、最終的な結論を下すべきではないと判断した。

## (3) ゲノムの進化の道筋を表す系統樹の構築

4遺伝子のデータを一括して用いることによって、現時点で得られているすべての情報に基づいたゲノム進化の系統樹構築を試みた。前項でグループ間の分岐順序を最終的に確定することが出来なかったので、ここで

は out group のデータを除き, *P. syringae* のみのデータで無根系統樹を求めた後, 今のところ最も可能性が高いと思われる (2, (1, 3)) のトポロジーに基づいて無根系統樹上に tentative root を想定しながら考察を試みる, という方針をとることにした。こうして得られた ML tree では, グループ 1, 2, 3 がいずれもブートストラップ確率 100% のもとで明瞭なまとまりを示した (図 1)。各グループ内のトポロジーは, 前項において out group を含む 33 OTU の concatenated sequence から求めた ML tree のものと完全に一致した。NJ および MP tree でも同様に, 各グループ内のトポロジーは out group を入れた場合の系統樹と完全に一致した。これは, 3 つのグループがいずれも 10 個前後という十分な数の OTU から構成されているので, トポロジーの推定が安定して得られているためであると考えられる。

#### (4) 物理地図の作製

*P. syringae* が進化の過程で 3 つのグループに分化した後, 各グループが別々の進化の道筋を歩むうちにグループ間でゲノムの構造にどのような違いができてきたのかについて評価を試みた。そのために, 分子進化学的解析によって明らかになった 3 つの単系統群 (図 1) からそれぞれ代表的な菌株 (グループ 1 から pv. *actinidiae*, グループ 2 から pv. *syringae*, グループ 3 から pv. *phaseolicola*) を選んでゲノムの物理地図を作製し, 比較を行った。その結果, 基本的な構造だけでなく, その大きささえもがゲノム間で大きく異なっていることが判明した (図 2)。生存のために必須のリボソーム RNA (*rri*) オペロンや *rpoD* までもが転座し, ゲノム上で大きく位置が異なっている様子も認められた。このことは, *P. syringae* のゲノムが可塑性に富んでおり, 挿入, 欠失, 転座や重複などのゲノム再編成が大規模かつ活発に起こった結果, グループ間や菌株間で構造に大きな差異が生じてきたことを示している。

次に, ここで得られた系統樹 (図 1) およびゲノムの物理地図 (図 2) 上に病原性関連遺伝子の情報を重ね合わせ, *P. syringae* におけるそれらの進化機構について以下で考察を試みていきたい。

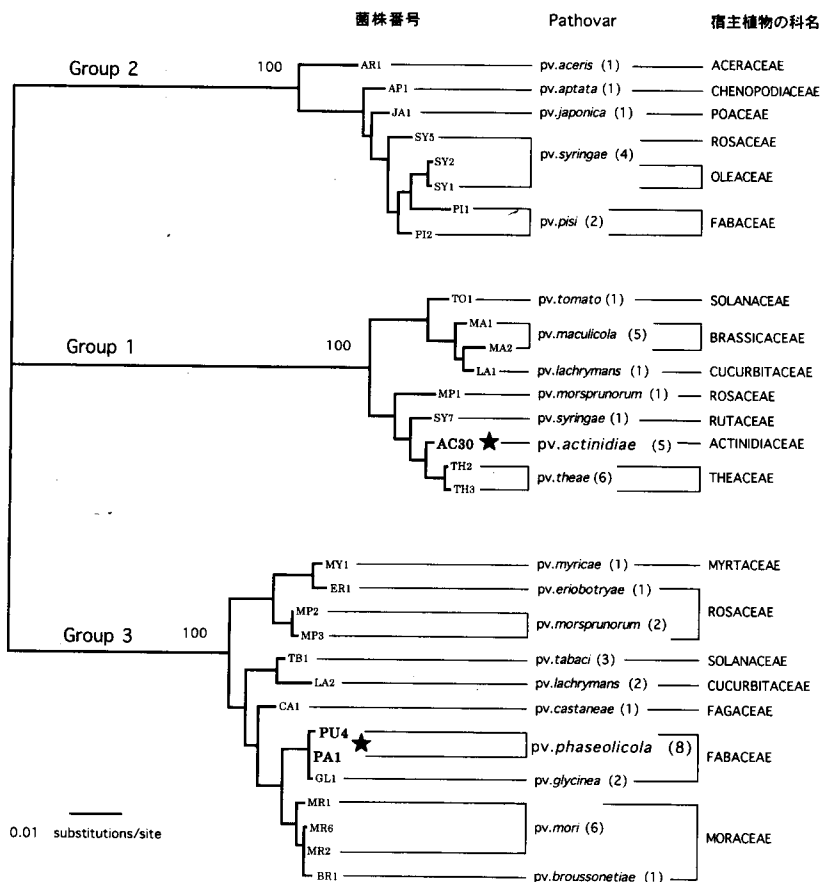


図1 *Pseudomonas syringae* 群細菌のゲノム進化を示す系統樹

ゲノム進化の指標とした4遺伝子 (*gyrB*, *rpoD*, *hrpL* および *hrpS*) から NucML で推定した最尤系統樹 (HKY85 モデル,  $\alpha/\beta=4.5$ )。枝長は推定塩基置換数に比例する。各枝の数字は局所的ブートストラップ確率 (%) を示す。ここに示したのは無根系統樹であるが、グループ間の分岐順序は (2, (1, 3)) である可能性が極めて高い。菌株番号の右に、各菌株の所属する pathovar と分離された宿主植物を示す。★をつけたのはファゼオロトキシンを産生し、かつ *argK*-*tox* cluster を有する菌株 (*pv. actinidiae* および *pv. phaseolicola*) である。

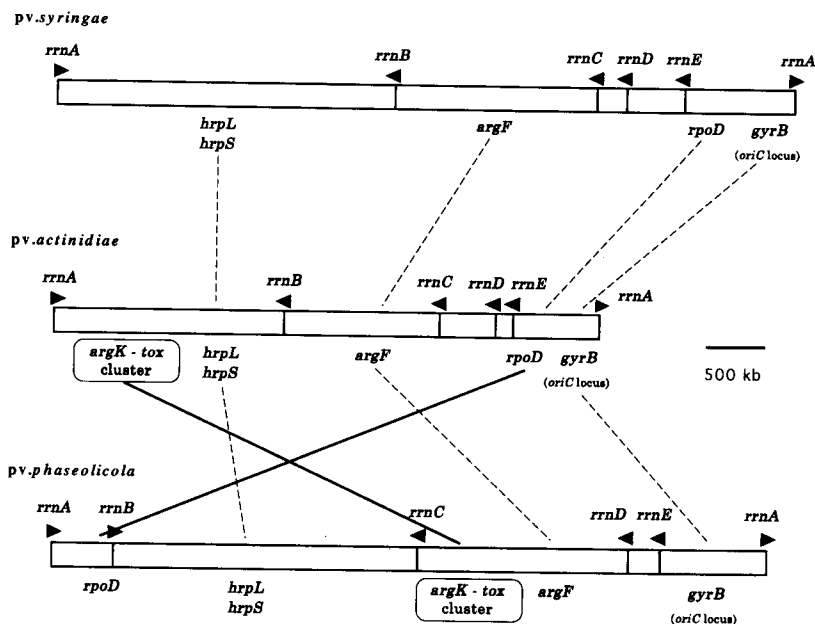


図2 *Pseudomonas syringae* 群細菌のゲノムの物理地図

*P.syr.* pv. *syringae* (ライラック枝枯細菌病菌), *P.syr.* pv. *actinidiae* (キウイフルーツかいよう病菌), および *P.syr.* pv. *phaseolicola* (インゲンかさ枯病菌)のゲノム構造を示す模式的な物理地図を示した。矢印は *rrn* オペロンの位置およびその転写方向を示す。破線で結んだのはゲノム間で存在位置が保存されている遺伝子の組み合わせ、実線は位置が大きく変わっている組み合わせを示す。

## 2. *P. syringae* 群内における *hrp* gene cluster の進化機構

*hrp/avr* 遺伝子群は *P. syringae* に普遍的に存在しており, 病原性や宿主範囲の決定に様々な形で関与していると考えられている<sup>11)</sup>。これらの遺伝子群のうち, 発現制御や産物の分泌という基本的な過程に関与しているものは, ゲノム上で *supraoperon* clustering 構造 (*hrp* gene cluster) をとっている。本研究で病原性関連遺伝子の代表として選んだ *hrpL* と *hrpS* は, この *hrp* gene cluster 内において左端と右端の境界領域近くにそれぞれ位置しており, *hrp/avr* 遺伝子群の発現制御に関わっていると考えられている。ここでは, *hrp* gene cluster と, その乗り物であるゲノムとの関係を

考えるために、前項における分子進化学的な解析結果を、*hrp* gene cluster の内側に関する部分と外側（ゲノム）に関する部分とに分けて整理し直し、対比を試みた。

cluster 外に存在する *gyrB* と *rpoD* は、いずれも 3 つの独立したグループに分化していることが、NJ, ML および MP 法による解析によって明らかになった。cluster 内の *hrpL* と *hrpS* についても全く同様の結果が得られた。しかも、各グループを構成する OTU に関しても、cluster 外と cluster 内で完全に結果が一致していた。3 グループ間の分岐順序については、不均質モデルを用いた TotalML による解析によって、*gyrB* と *rpoD* のどちらにおいても (2, (1, 3)) の尤度が最もいいという結果が得られた。*hrpL* と *hrpS* についても全く同様に (2, (1, 3)) が最尤系統樹となっている。

以上のように、いずれの点に関しても、cluster の外側と内側に関するデータ間に傾向の違いはまったく認められない。しかも、ゲノムの物理地図上に *hrpL* と *hrpS* をマッピングしたところ、その存在位置が菌株間で保存されていることも明らかとなった（図 2）。したがって、筆者らの供試菌株に関しては、*hrp* gene cluster は少なくともグループ間にまたがるような水平移動はしておらず、グループ単位で考える限り、*hrp* gene cluster と cluster が乗っているゲノムとは同じ進化の道筋を経てきた、と考えることができるのではないだろうか。

ところで、*hrp* gene cluster の働きによって発現制御を受けたり、産物が菌体外へ分泌されたりするさまざまな病原性関連遺伝子が、*hrp* gene cluster 以外のゲノム上やプラスミド上にも存在していることが明らかになってきた<sup>11,13)</sup>。したがって、*hrp* gene cluster によってもたらされる病原性の分化について真に理解するためには、発現制御・分泌システムであるいわゆる「core *hrp* gene cluster」の本体部分だけでなく、その影響下にあるさまざまな遺伝子群のデータについても体系的に整理し、解析を行う必要があると考えている。

### 3. *P. syringae* 群内における *argK* (*argK-tox* cluster) の進化機構

#### (1) *P. syringae* 群内における *argK-tox* cluster の分布の拡大

次に、解析のためのモデルとして選んだ病原性遺伝子は、植物の葉に黄色い病斑(halo)を形成するファゼオロトキシンという毒素の産生遺伝子群(*argK-tox* cluster)である。ファゼオロトキシンは anabolic ornithine carbamoyltransferase (aOCTase) を標的蛋白質とする非特異的毒素であり<sup>1)</sup>, その産生能を有する病原細菌は, *P. syringae* に属するインゲンかき枯病菌 *P. syr.* pv. *phaseolicola* とキウイフルーツかいう病菌 *P. syr.* pv. *actinidiae* という2つの pathovar だけであると考えられてきた<sup>1,14)</sup>。しかし、この2つの pathovar は、系統樹上においてまったく異なる2つのグループ (pv. *actinidiae* はグループ1, pv. *phaseolicola* はグループ3) に点在している(図1)。それでは、pv. *actinidiae* や pv. *phaseolicola* と同じグループに属する近縁の pathovar も *argK-tox* cluster を保持しているのだろうか? 疑問を持った筆者らは供試菌株をすべて調べてみたが、pv. *actinidiae* や pv. *phaseolicola* 以外に *argK-tox* cluster を有するものはなかった。伝達性のプラスミド上ではなく、ゲノム上に存在している *argK-tox* cluster が、なぜ系統進化の上で大きく異なる2つのグループにまたがって点在しているのだろうか、その分布拡大の機構についてさらに解析を進めてみた。

まず、*argK-tox* cluster 内部に存在する病原性遺伝子群の中から *argK* (ファゼオロトキシン耐性の aOCTase 遺伝子; 自家中毒を回避する機能を担う) を指標として取り上げて配列を決定したところ、pv. *actinidiae* と pv. *phaseolicola* に属する全供試菌株(13菌株)の配列はすべて完全に一致しており、同義置換さえまったく存在しないことが明らかとなった。すなわち、別々の進化過程を経てきた結果(図1)、構造が大きく異なっている2つのゲノム上に(図2)、まったく同一の遺伝子が分布しているわけである。しかも、*argK* を含む *tox* cluster をゲノムの物理地図上にマッピングしてみたところ、pv. *actinidiae* と pv. *phaseolicola* とではまったく異なる

位置に存在していた (図 2)。

以上のことを考えあわせると, *argK*, あるいは *argK-tox* cluster の分布の拡大に関して, 以下の 3 つの仮説が考えられる。すなわち, 1) *argK* は pv. *actinidiae* と pv. *phaseolicola* の共通の祖先 (グループ 1 と 3 の共通祖先) のゲノム上へと, *argK* の origin となった菌から水平移動によって入った後, 共通祖先が各 pathovar へと分化するのにともない, pv. *actinidiae* および pv. *phaseolicola* のゲノム上でそれぞれのゲノムとともに進化の道筋を歩んできた (少なくとも pathovar 分化後に *argK* の水平移動は起きていない), 2) pv. *actinidiae* と pv. *phaseolicola* が別々のグループとして分化した後の段階で, *argK* が origin から pv. *actinidiae* あるいは pv. *phaseolicola* のどちらか一方に水平移動で一旦入り, その後, そこからもう一方の pathovar へと 2 回目の水平移動によって分布を広げた, あるいは 3) 両 pathovar が分化した後, *argK* は origin から pv. *actinidiae* および pv. *phaseolicola* の 2 つの pathovar へと 2 回の独立の水平移動によってそれぞれに入った, という 3 つの仮説が考えられる。

これらの仮説について, 筆者らが得たデータをもとに検証を試みた。すなわち, 4 遺伝子 (*gyrB*, *rpoD*, *hrpL* および *hrpS*) の concatenated sequence と *argK* に関して, pv. *actinidiae* と pv. *phaseolicola* との間で同義置換距離を求めたのち, 両 pathovar 間で *t* 検定を行ったところ, 大きな有意差が認められた。このことは, これら 2 つの pathovar では, *argK* と 4 遺伝子 (ゲノム) とは同じ進化の道筋を歩んではない, ということを示している。両 pathovar 以外の供試菌株はすべて *argK* の非保有株であること, 両 pathovar 間で *argK-tox* cluster のゲノム上における位置が大きく異なっていること (図 2) も考え合わせると, 「*argK* は pathovar 分化後に水平移動を経験したために, ゲノム上の他の遺伝子とは塩基置換のパターンに大きな違いが生じた」, ということが強く示唆されてくる。したがって, 最初に述べた 3 つの仮説のうちの 1) は棄却されることになり, 本群内における *argK* の分布拡大には, 「pathovar 間をめぐる水平移動」というダイナミックな進化機構が関与している可能性が浮かび上がってくる。



(2) *argK* (*argK-tox* cluster) は本当に外来性なのか？

*argK-tox* cluster が水平移動を経験しているとしたら、その元々の起源は *pv. phaseolicola* なのか、*pv. actinidiae* なのか、あるいは本群以外の菌種(すなわち外来性)なのか、この点に関しても *argK* を手がかりにして解析を試みた。まず、OCTase 遺伝子の系統進化史における *argK* の位置づけを明らかにするために、現在報告されているすべての OCTase 遺伝子を用いて遺伝子系統樹を構築した(図 3)。その結果、生物進化のごく初期に起こった遺伝子重複によって ACTase (アスパラギン酸カルバモイルトランスフェラーゼ) 遺伝子と OCTase 遺伝子とが生じた後、OCTase 遺伝子はさらに遺伝子重複を起こし、そのため OCTase 遺伝子には 2 つのパラログ(ここでは type A および type B と表記した)が存在していることが明らかとなった。type A には真正細菌の OCTase のみが含まれているが、type B には真正細菌、古細菌、真核生物という 3 つの domain がすべて入っている。ただし、グループ間の分岐順序を示すブートストラップ確率は余り高くないので、分岐順序に関しては決定的な判断はできないであろう。以上のことを図 4 に模式的に示してみた。もし OCTase 遺伝子に重複がなかったとすると、A のような単純な形の系統樹になったはずであるが、その可能性は否定されたことになる。今回得られた系統樹は C の場合に相当する。すなわち、3 つの domain の分岐の前に重複が起こって type A と type B の OCTase が生まれ、その後で 3 つの domain への分岐が起こった、ということを示している。また、この C の場合では、古細菌と真核生物の系統で type A の欠失が起こった、と考える必要がある。ただし、今回得られた系統樹(図 3)ではグループの分岐順序について決定的なことはいえないので、B の可能性も否定できないであろう。すなわち、3 つの domain が分岐した後の段階で、真正細菌の系統でのみ独立に重複が起こった、という可能性も残されているのである。しかし、いずれにしても、重複によって ACTase 遺伝子と OCTase 遺伝子が生まれた後で、さらに 2 回目の重複が OCTase 遺伝子側で起こり、その結果、少なくとも真正細菌の OCTase には type A と type B という 2 種類のパラログが存在している、という点についてははっきり言えるのではないだろうか。このことを考慮しながら、

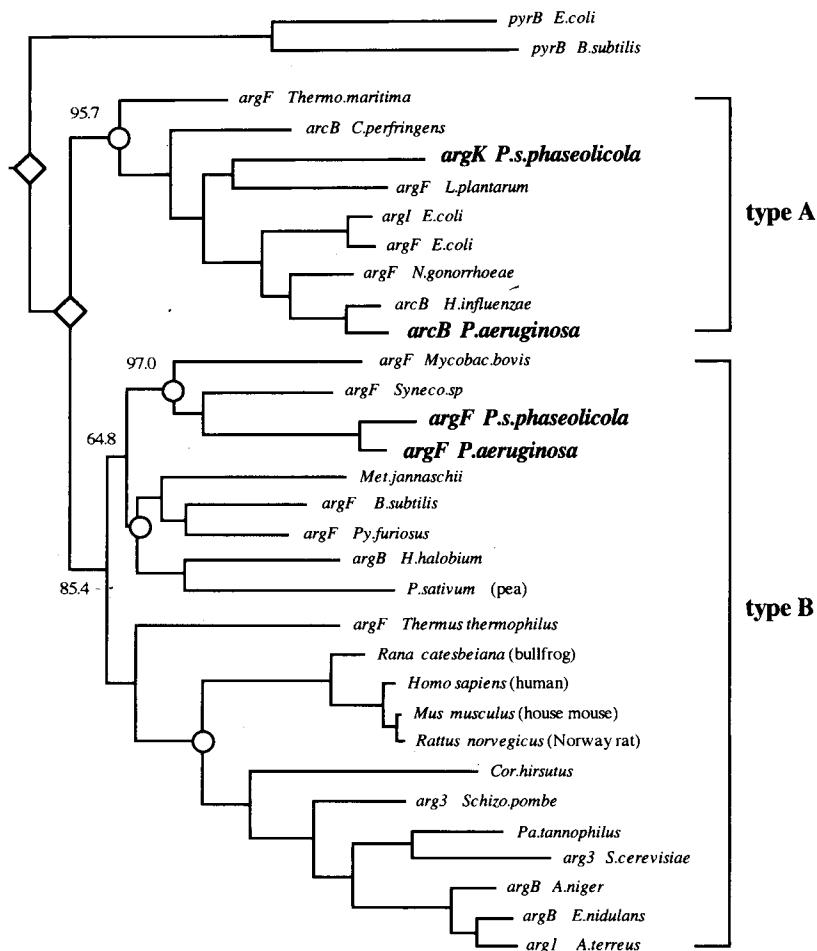


図3 OCTaseのアミノ酸配列から推定した最尤系統樹 (JTT-F model)  
系統樹の分岐点における○は種分化, ◇は遺伝子重複を示す。

*argK* の起源についてさらに考察を進めたい。

*argK* が *P. syringae* のゲノム上に元々から存在していたのであるならば, 16S rDNA を指標として構築した系統樹 (図5) と OCTase 系統樹 (図3) のどちらにおいても, *P. syringae* の位置づけは一致しているはずである。すなわち, どちらの系統樹においても, *Proteobacteria* gamma subclass

の中でも特に *P. aeruginosa* のごく近傍に位置づけられるはずである。しかし、実際は、*argK* は OCTase 系統樹の type A クラスター内において、Low G+C gram-positive の菌種 (*Bacillus* 属細菌の仲間などを含む、*P. syringae* とは系統進化上遠縁の細菌群) の OCTase 遺伝子と極めて近い関係にあることが認められた (図 3)。

*argK* が *P. syringae* のゲノム上に元々から存在していたかどうかについて、GC 含量に関連した指標を用いてさらに検討を試みた (表 2)。GC% については *P. syringae* のゲノムでは 56~58% という値が得られたが、*argK* では 49.4% という低い値となった。また、コドンの第 3 座位は同義座位であるため、その GC% はゲノムから遺伝子がどのような影響を受けてきたのかを測るための指標となることが期待できる。そこで、*P. syringae* のゲノム上に存在する CDS の平均値を求めたところ 68.0% という非常に高い値が得られたが、対照的に *argK* では 55.2% という低い値となった。さらに、コドン使用頻度のパターン、すなわち同義語コドンのうちのどれがよく使われているか、という傾向を主成分分析によって解析したところ、*argK* の第 1 主成分は -0.95 となり、*P. syringae* のゲノム上に存在する

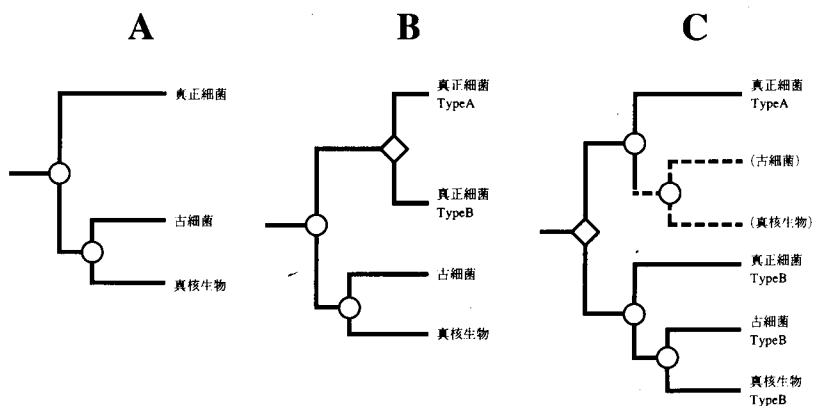


図 4 OCTase 遺伝子の重複に関する 3 つの仮説

A: 遺伝子重複がなかった場合; B: domain の分岐後に真正細菌の系統でのみ独立に遺伝子重複が起きた場合; C: domain の分岐前に遺伝子重複が起きた場合 (古細菌/真核生物の系統では type A は欠失した)。系統樹の分岐点における○は種分化, ◇は遺伝子重複を示す。

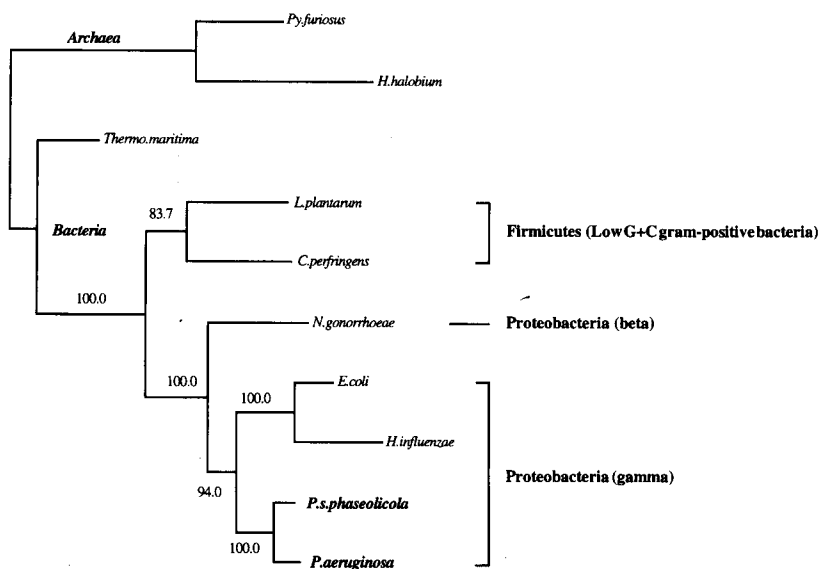


図5 16S rDNA の塩基配列に基づく最尤系統樹 (HKY85 model,  $\alpha/\beta=1.78$ ) OCTase 系統樹 (図3) における type A クラスターを構成する真正細菌の系統関係を示す。

表2 GC% プロフィールに基づく *P. syringae* のゲノムの特徴

	ゲノム全体	ゲノム上の CDS	<i>argF</i>	<i>argK</i>	DES
GC (%)	56	56~58	57.3	49.4	49.6
3rd GC (%)	—	68.0	67.8	55.2	55.4
ZI <sup>a</sup>	—	—	0.00	-0.95	-1.36

<sup>a</sup> コドン使用頻度データの主成分分析における第1主成分

CDS の一般的傾向とは大きく異なっていることが明らかとなった。以上のように, *argK* はいずれの指標に関しても *P. syringae* のゲノム上の遺伝子一般の傾向とは大きく異なっており, *P. syringae* にとって「異質な」遺伝子であることが明らかとなった。さらに, *argK* とともに *tox* cluster 内部に存在している fatty acid desaturase 遺伝子 (DES) についても, *argK* と同様な傾向が確認できた(表2)。以上のことから, 少なくとも *argK*-*tox*

cluster 内には、本群以外の菌種から水平移動によって獲得された外来性のモジュールが存在している、と考えることができるであろう。

ところで、*P. syringae* のゲノム上には、*argK* 以外にもう 1 つ *argF* (ファゼオロトキシン感受性の aOCTase 遺伝子; *tox* cluster 領域外のゲノム上に存在しており (図 2), housekeeping な機能を担う) という type B に属する OCTase 遺伝子が存在している。*argF* の type B クラスター内における位置 (図 3) は *P. syringae* の系統進化上の位置づけ (図 5) と一致している上、そのコード領域全体の GC%, コドン第 3 座位の GC%, およびコドン使用頻度のいずれもが *P. syringae* のゲノム上の遺伝子一般の傾向と一致していることが認められた (表 2)。しかも、*argF* のゲノム上における存在位置は 3 つの pathovar 間で保存されていることも明らかとなった (図 2)。以上のことから、*argF* は外来性ではなく *P. syringae* のゲノム上に元々から存在していたものであろう。

そうすると、*P. syringae* における *argF* のパラログはどうなってしまったのだろうか。つまり、真正細菌には遺伝子重複に由来する 2 つの OCTase 遺伝子が存在しているはずである (図 3, 4)。また、*argK* は外来性であり、*argF* の方はもとから *P. syringae* のゲノム上に存在していたものであるとすると、*P. syringae* のゲノム上には重複に由来する type A の OCTase 遺伝子がもう一つ存在しているはずである。しかも、それは *P. aeruginosa* の *arcB* に近い catabolic OCTase (cOCTase) ではないか、ということが考えられる。そこで、そのことをサザン分析で確認を試みたが、供試したいずれの *P. syringae* から *arcB* の直系遺伝子に相当するものは検出できなかった。また、*P. aeruginosa* の *arcB* は、*arcDABC* という構成で *arc* オペロンとして組織化されている<sup>15)</sup>。そこで、*P. syringae* から *arcA* や *arcD* の直系遺伝子の検出も試みてみたが、いずれの菌株からも確認できなかった。したがって、*P. syringae* では *arcB* に相当する cOCTase 遺伝子は、*arc* オペロンごと欠失してしまったことが考えられる。以上のことから、*P. syringae* の祖先種のゲノム上に存在していたであろう aOCTase および cOCTase 遺伝子のうち、後者が欠失した後、*argK* を含む *tox* cluster が外部から侵入したため、pv. *actinidiae* と pv. *phaseolicola* のゲノム上に

は aOCTase 遺伝子のみが 2 コピー (*argF* と *argK*) も存在するという特殊な構成となった, という OCTase 遺伝子の進化史が見えてくる。

## おわりに

筆者らが供試した *P. syringae* 群細菌は, 系統進化の上で 3 つの異なるグループ (単系統群) に分化していること, *hrp* gene cluster の本体部分は本群内において少なくともグループ間にまたがるような水平移動は経験していないのに対し, *argK* (*argK-tox* cluster) は外来性であり, 水平移動によって分布を拡大してきたことが認められた。環境汚染物質分解菌の分解代謝系では, 関連遺伝子が supraoperon clustering の構造をとってトランスポゾンや伝達性プラスミド上に存在していることがあり, ゲノム再編成や遺伝子の水平移動がこれらの進化を加速し, 多様性を生み出してきたと考えられている<sup>16)</sup>。*P. syringae* においても, コロナチン・プラスミドの *in planta* 伝達が確認されていたが<sup>17)</sup>, ゲノム上に存在している病原性関連遺伝子についても, ここへきてそのダイナミックな進化機構がようやく垣間見えてきたといえるのではないだろうか。

*P. syringae* の仲間には非病原性のものがあり, さまざまな植物体表面で腐生生活をしていることが知られている。*P. syringae* のゲノムが極めて可塑性に富んでいることから, このような非病原性菌株のゲノム上に外部から病原性関連遺伝子が侵入し, 新たな病原菌が誕生する, あるいは, ゲノム上での再編成の結果, 新たな病原性遺伝子群が組織化される, という病原性分化のストーリーを想像することは可能であろう。しかし, 肝心のゲノムの可塑性をもたらす要因, すなわち, ゲノム再編成や遺伝子の水平移動などの具体的なメカニズムが *P. syringae* では今のところ全く不明である。*argK-tox* cluster という pathogenicity island 様の構造をマーカーとして利用し, これら残された多くの課題を解き明かしていきたいと考えている。

## 参考文献

- 1) Singh, U.S., Singh, R.P., and Kohmoto, K. (eds) (1995) Pathogenesis

- and host specificity in plant diseases. Elsevier Science Ltd, Oxford, UK.
- 2) Young, J.M., Takikawa, Y., Gardan, L., and Stead, D.E. (1992) Annu. Rev. Phytopathol. 30 : 67-105.
  - 3) Bradbury, J.F. (1986) Guide to plant pathogenic bacteria. CAB International Mycological Institute, Kew, United Kingdom.
  - 4) Daniels, M.J., Dow, J.M., and Osbourn, A.E. (1988) Annu. Rev. Phytopathol. 26 : 285-312.
  - 5) Sawada, H., Takeuchi, T., and Matsuda, I. (1997) Appl. Environ. Microbiol. 63 : 282-288.
  - 6) Sawada, H., Suzuki, F., Matsuda, I., and Saitou, N. (1999) J. Mol. Evol. in press.
  - 7) Sawada, H., Kanaya, S., Suzuki, F., and Matsuda, I. submitted.
  - 8) 澤田宏之 (1999) 化学と生物 37 : 84-86.
  - 9) Yamamoto, S., and Harayama, S. (1996) Int. J. Syst. Bacteriol. 46 : 506-511.
  - 10) Lonetto, M., Gribskov, M., and Gross, C.A. (1992) J. Bacteriol. 174 : 3843-3849.
  - 11) Gopalan, S., and He, S.Y. (1996) Plant Disease. 80 : 604-610.
  - 12) Adachi, J., and Hasegawa, M. (1996) MOLPHY ; Programs for Molecular Phylogenetics, ver. 2.3. Institute of Statistical Mathematics, Tokyo, Japan.
  - 13) Juan, Y., and He, S.Y. (1996) J. Bacteriol. 178 : 6399-6402.
  - 14) 田村勝徳, 今村美和, 米山勝美, 河野芳樹, 山口 勇, 高橋秀夫 (1997) 日植病報 63 : 263 (講演要旨).
  - 15) Gamper, M., Zimmermann, A., and Haas, D. (1991) J. Bacteriol. 173 : 4742-4750.
  - 16) 津田雅孝 (1996) IGE シリーズ 23 遺伝生態情報の可能性 p. 85-100 東北大学遺伝生態研究センター
  - 17) Sato, M. (1988) Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 54 : 20-24.





# エンドファイトの農業利用と共生機構

羽 柴 輝 良

エンドファイト (endophyte) とは, endo=within と phyte=plant の合成語で, 植物体の表面で生活する菌類であるエピファイト (epiphyte) に対して, 植物体の組織や細胞内に侵入して生活する菌類を示し, “生きた植物体内に共生的もしくは害を与えずに生活している菌類” という意味で定義されている。Wilson は “生活史のすべて, あるいは, ある期間生きた植物体内に侵入し, 病徴を示さず, 感染による兆候も起こさずに, 植物組織内で生活する菌類及び細菌類” と幅広く定義している<sup>1)</sup>。植物病原菌の多くも植物内に侵入して生活しているが, エンドファイトに含めないのが一般的である。しかし, 病原菌と共生菌の境界はあいまいであり, 条件によっては病原菌にも成り得るし, 共生菌にも成り得る。

## 1. 根部に共生するエンドファイト

エンドファイトと言えば, イネ科植物等に共生している麦角菌科 *Neotyphodium* に属する糸状菌が最も良く知られており, これは植物の地上部である茎葉部内に定着する菌類で古くから研究されている。一方, 地上部と同様に根部に定着しているエンドファイトも存在する。この根部エンドファイトは, 広義には菌根菌, 特に内生型の VA 菌根菌やラン及びツツジの菌根菌を含む。ここでは菌根構造を形成せずに植物に病害を生じない菌類について述べる。

植物に病害を生じる病原菌の研究は, 安定して作物生産を行うためにも

重要であり、古くから多くの研究者によって研究が行われ、数多くの知見の蓄積がある。また、共生菌でもキノコを生じる外生菌根菌や、肉眼でも確認出来るような大型の胞子を形成する VA 菌根菌等の研究も活発に行われ、応用にまで至っている。しかし、外観からエンドファイトが感染しているかどうか区別が出来ないので、エンドファイトの研究は分離・同定及び生態的な面に中心がおかれ、応用面に至る研究は少ない。

根部エンドファイトを得るには、植物根部から菌類を分離し、形態観察を行い同定する。分離された根部エンドファイトは、培地上で暗色の分生子や菌糸等から構成されるコロニーを形成し、比較的生育が遅いのが特徴である。分離された多くの菌株が胞子を形成せず、たとえ形成しても見つけにくく、形態的特徴から同定することは困難である。1922 年に、Melin はこれらの菌類を形態的特徴から、*Mycelium Radicis Atrovirens* (MRA) としてグルーピングした<sup>2)</sup>。その後、*Phialophora finlandia*, *Chloridium paucisporum*, *Phialocephala fortinii*, *Leptodontidium orchidicola* の 4 種が胞子を形成し、同定されている<sup>3,4)</sup>。しかし、大部分は、胞子形成が認められないため、未同定のままである。そのため、形態に頼らない同定方法として、rDNA の ITS 領域を使った分子生物学的アプローチが行われ、胞子形成が認められない数種の菌株の同定に成功している<sup>5)</sup>。今後、多くの種で形態に頼らない手法での同定技術の確立が発展するものと思われる。

## 2. 根部エンドファイトと宿主植物との共生関係

根部エンドファイトと宿主植物とが共生関係にあると、根部エンドファイトが宿主植物の生育を促進する。高山帯に自生するスゲ属植物の健全な側根には、根部エンドファイトが定着している<sup>6)</sup>。分離した根部エンドファイト 2 菌株を無菌的に育てた宿主植物に接種し、乾物重を測定したところ、地上部及び地下部の両方で生育促進効果が認められ、根部エンドファイトを接種することにより宿主植物のリン酸含有量が増加することも報告されている<sup>6)</sup>。また、根部エンドファイト *Cladorrhinum foecundissimum* がワタの根内に共生すると、開花期には草丈が 2 倍以上に伸長し、植物体中のリン酸含有量も倍加することも報告されている<sup>7)</sup>。ハクサイ根部に定着す

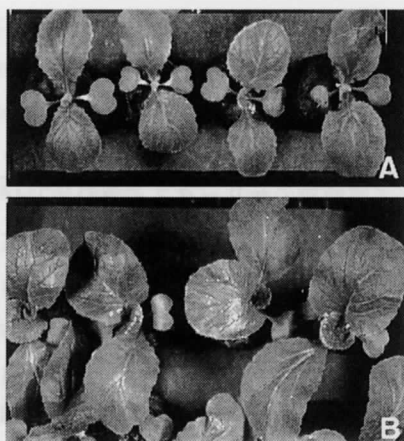


図1 根内エンドファイト接種による生育促進効果  
A: 対照区, B: 根内エンドファイト接種区

るエンドファイト *Heteroconium chaetospora* もハクサイ苗の生育を促進することが報告されている (図1)<sup>8,9)</sup>。インドの砂漠土壌より分離された *Piriformospora indica* も植物体のリン酸含有量を増加させ、生育を促進する<sup>10)</sup>。また、地上部のエンドファイトとして報告のある *Neotyphodium coenophialum* も牧草の根部に定着し、宿主の生育を促進すると報告されている<sup>11)</sup>。以上はすべて菌類側から植物側へ与える利益である。しかし、菌類側の利益に関する報告はない。この疑問に対して多くの研究者は、菌が生息する場所として根を供給していると答えている。確かに、根面あるいは土壤中に比べ、根内に生息出来ることは他の菌類との競合の点から見ても有利であることは否定出来ないが、実験的に証明された例はない。VA菌根菌やランの菌根菌等では、嚢状体、樹枝状体、及び菌球等の構造物を作り、主にその構造物を介して宿主植物との物質交換を行っていることが明らかにされている。しかし、根部エンドファイトはそのような構造物を作らず、菌糸のみで細胞間あるいは細胞内に定着しているので、物質レベルで植物側から菌類側への移行に関する研究は進んでおらず、報告もない。

### 3. 根部エンドファイトの宿主特異性

2種の根部エンドファイト *Leotodontidium orchidicola* 及び *Phialocephala fortinii* を4種類の高山・亜高山帯植物、すなわちキンロバイ、チョウノスケソウ、ヤナギ属植物のサリックスグラウカ及びカナダトウヒに接種し、被接種植物体の乾物重を測定することにより宿主特異性を調査したところ、2種のエンドファイトとも、宿主特異的であることが報告されている<sup>12)</sup>。一方、ハクサイの根部エンドファイト *H. chaetospira* は、アブラナ科以外にもウリ科、セリ科、キク科、アオイ科、ナス科、アカザ科及びネギ科に定着し(表1)<sup>8,9)</sup>、*P. indica* もモロコシ等のイネ科植物、タバコ及び樹木にも定着することが確認されており<sup>10)</sup>、宿主特異性はなく、むしろ宿主範囲が広いことがわかっている。このように、宿主特異性に関しても、ごく

第1表 *Heteroconium chaetospira* の宿主範囲

供試植物		定着率 (%)
アブラナ科	ブロッコリー	89
	キャベツ	95
	ダイコン	56
	カリフラワー	89
	マスタード	56
	ストック	56
	ナバナ	22
	クレソン	44
ナス科	ナス	30
	トマト	56
ウリ科	メロン	56
	スイカ	56
セリ科	ニンジン	33
キク科	レタス	89
アオイ科	オクラ	22
ユリ科	ネギ	13
	タマネギ	0
シソ科	バジル	100
	シソ	67

限られた種類で報告されているのみであるが、植物と微生物との相互作用を分子レベルで解明するモデルとして、根部エンドファイトの利用が有望視され、研究が進められている。

#### 4. 土壌病害防除への利用

土壌病害防除への利用では、筆者らのグループによる根部エンドファイト *H. chaetospora* によるハクサイの土壌病害防除への取り組みが唯一の報告である<sup>8,9)</sup>。土壌病害の生物防除に使用されてきた大部分の生物防除資材は、主に植物の根圏に定着するものであった。植物の根圏は、植物の根と土壌との接点であり、変化しやすい複雑な環境であるため、植物と病原菌の相互作用の解明が困難であり、生物防除による病害抑制効果を妨げる大きな要因となってきた。

そこで、筆者らはエンドファイトの性質を利用して、植物根内に相互作用の場を移し、*Plasmodiophora brassicae* によるハクサイ根こぶ病 (図2) 及び *Verticillium dahliae* によるハクサイ黄化病 (図3) の難防除病害を制御することに成功した<sup>8,9)</sup>。この *H. chaetospora* は、ハクサイ根の表面に付着器を形成し、そこから侵入菌糸を延ばし、皮層細胞内に達し、細胞内菌糸を形成する。この細胞内菌糸が再び付着器を形成し、侵入を繰り返し、皮層細胞内を移動し、定着部位を拡大していくという一連の定着過程をとる

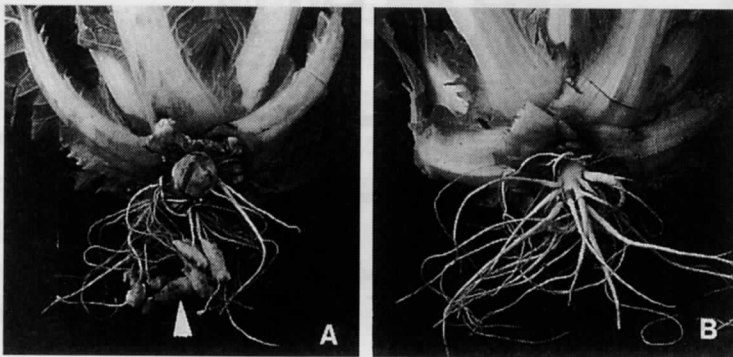


図2 ハクサイ根こぶ病防除試験

A: 対照区, B: 根内エンドファイト接種区, 矢印: 根こぶ形成



図3 ハクサイ黄化病防除試験  
左：対照区，右：根内エンドファイト接種区

(図4)。本エンドファイトは、ハクサイ根内、特に根端部に移動・定着することにより、根こぶ病菌や黄化病菌などの病原菌の根内への侵入を防いでいた(図5)。なぜ、根端部に定着すると宿主植物に病原菌が感染できない

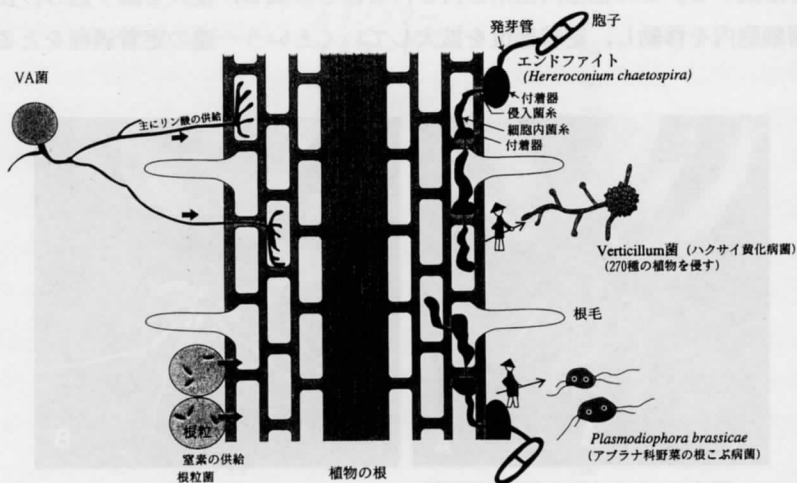


図4 *H. chaetospora* のハクサイへの侵入，定着過程

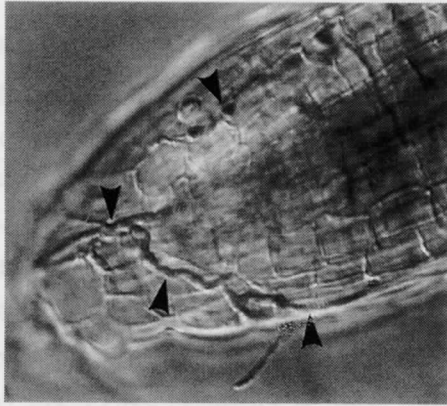


図5 ハクサイ根端部の皮膚細胞内に定着している根内エンドファイト  
矢印：根内エンドファイト

のか？ 現在、病害抑制能力に変化が生じた本エンドファイトの突然変異体を利用して、分子レベルでの解明が精力的に進められている。また、バナナの根部より分離されたエンドファイトの *Radopholus similis* (センチチュウ) に対する効果も検討されている<sup>13)</sup>。

## 5. 根部エンドファイトの安全性

根部エンドファイトは、地上部のエンドファイトとは分類的に全く異なるグループで有り、家畜及び他の生物に対する毒性の報告もない。中でも、根部エンドファイト *H. chaetospira* は、植物毒性、抗細菌性、マイコトキシン及びマウスに対し経口急性毒性を示さなかった。

土壌中には植物と共生関係にある菌類、VA 菌根菌、ランやツツジの菌根菌、マツ等の外生菌根菌等が存在することが古くから知られており、毒性で問題になったことは全くない。根部エンドファイトも、根部への侵入・定着過程等で、地上部のエンドファイトよりも、むしろ菌根菌に近い性質を示す。根部エンドファイトの研究の進展に伴い、菌根菌との類縁関係も次第に明らかになることが期待される。

## 6. 根部エンドファイトの今後の展望

植物の根から注意深く菌類の分離を行うと、培地上で暗色コロニーを形成し、比較的生育が遅く、孢子形成をしない菌類に出会う可能性は高いと思われる。大部分は、形態的特徴によって同定することが困難なため、実験室の隅に追いやられていたり、果ては目的の菌類のコンタミとして破棄されていることも多い。それらの菌類の中には、植物と共生関係にある根部エンドファイトが潜んでいる可能性が大いにある。数多く存在する土壤菌の中で、どの菌類が植物と共生関係を結び、エンドファイトに定着する能力があるのか、今後、研究が進むにつれて、おそらく、想像を越える数の菌類が根部エンドファイトであることが明らかに成るであろう。上述の *H. chaetospora* に関しても土壤菌としては古くから知られているが、植物と共生関係にあるエンドファイトで有り、しかも土壤病害防除に有効であることが、我々のグループによって初めて明らかにされた。この未知の可能性を秘めた菌類のグループである根部エンドファイトは、まさに新しい資源を生み出す宝庫である。近い将来、これらマイナーな菌類が脚光を浴び、研究が発展することを期待する。

### 参考文献

- 1) Wilson, D. (1995) *Oikos* 73: 274-276.
- 2) Melin, E. (1922) *J. Ecol.* 9: 254-257.
- 3) Currah, R.S., Sigler, L. and Hambleton, S. (1987) *Can. J. Bot.* 612: 107-114.
- 4) Wang, C.J.K. and Wilcox, H.E. (1985) *Mycologia* 77: 951-958.
- 5) Harney, S.K., Rogers, S.O. and Wang, C.J.K. (1997) *Mycol. Res.* 101: 1397-1404.
- 6) Haselwandter, K. and Read, D.J. (1982) *Oecologia* 53: 352-354.
- 7) Gasoni, L. and Gurfinkel, B.S. (1997) *Mycol. Res.* 101: 867-870.
- 8) Narisawa, K., Tokumasu, S. and Hashiba, T. (1998) *Plant Pathol.* 47: 206-210.
- 9) Narisawa, K., Ohki, T. and Hashiba, T. (1999) *Plant Pathol.* (in press)
- 10) Franken, P., Britta, B. and Varma, A. (1998) *ICOM2* (abstract) 65.
- 11) Azevedo, M.D. and Welty, R.E. (1995) *Mycologia* 87: 289-297.



- 12) Fernando, A.A. and Currah, R.S. (1996) Can. J. B. 74: 1071-1078.
- 13) Schuster, R.P. and Sikora, R.A. (1997) J. Nematol. 29: 606.



# エンドファイトの耐虫性付与と 宿主特異性機構

古 賀 博 則

## はじめに

エンドファイトが一躍注目を浴びるようになったのは、アメリカ合衆国で問題となっていたフェスク・トキシコーススと呼ばれる牛の中毒症状の原因として、1977年にエンドファイト説が提唱されてからである<sup>1)</sup>。その後の研究で、エンドファイトに感染している植物は非感染植物と比べると、干ばつに強くなることが明らかとなった。したがって、エンドファイトの家畜毒性が知られていなかった時期には、耐乾性植物を選抜していくと、エンドファイトに感染した植物が選抜され、それが畜産農家に普及していったものと考えられる。また農家の草地でも干ばつの度に、エンドファイトに感染した植物のみが淘汰されていったものと推測される。その結果、エンドファイトに感染したトールフェスクを多量に摂食した家畜が、中毒症状を起こすようになったと説明される。このように、このエンドファイトは、耐乾性付与という有益面と家畜中毒という有害面の両面を一緒に持っていて、干ばつという淘汰圧がかかったことによって、エンドファイトに感染した植物の比率が増加して家畜中毒が起きるようになったものと推測されている<sup>2)</sup>。

一方ニュージーランドでは、ペレニアルライグラスを摂食した羊が神経筋機能の低下と同時に、首や四肢に震えをを起こすライグラス・スタッガーと呼ばれる疾病が問題となっていた。このライグラス・スタッガーもペレ

ニアルライグラス中のエンドファイトが原因であるという説が1981年に提唱された<sup>3)</sup>。ニュージーランドではオサゾウムシの一種の *Argentine stem weevil* という害虫が大発生し、ペレニアルライグラスの草地を喰い荒らし大問題となっていた。しかし、エンドファイトに感染した植物は、この害虫に対して強い耐虫性を発揮する。したがって、ニュージーランド中にエンドファイトに感染した植物のみが淘汰され、増殖していったことは容易に想像できる。このように、ニュージーランドでは害虫が淘汰圧となって、エンドファイトに感染した植物が増え、それを摂食した家畜が中毒症状を起こすようになった。

家畜はエンドファイトに感染した植物を好んで食べるのではなく、感染していないものを先に食べて、それがなくなるとやむを得ずエンドファイト感染植物を食べて中毒を起こすことが知られている。家畜中毒が有害というのは人間から見た観点であって、植物が草食獣に食べられないで生き残っていくためには、家畜中毒はきわめて有益な機能であると考えられる。

このエンドファイトは、そもそもは病原菌であったものが、長い進化の過程で共生菌へと変わってきたものと考えられており、微生物の共生戦略という観点からも極めて興味深い。ここでは、このイネ科のエンドファイトの種類と生活史、とりわけ耐虫性付与そして人工接種した時に問題となるエンドファイトと植物間の特異性について述べる。

## 1. イネ科植物エンドファイトの種類と生活史

### 1) イネ科植物エンドファイトの種類

自然界でエンドファイトが感染しているイネ科植物は、300種を超えるものと推測されている。主として  $C_3$  植物に共生するエンドファイトとしては、*Neotyphodium* 属菌や *Epichloë* 属菌などがあり、主として  $C_4$  植物に共生するエンドファイトとしては、*Ephelis* 属菌や *Balansia* 属菌などがある(表1)。また、その生活史で子座を形成するかどうかで2つのタイプに分けられる。すなわち、一つは子座を形成することなく、一生を植物体内で過ごす非子座形成エンドファイト(*Neotyphodium* 属菌など)で、もう一つは、子座形成のために植物体外で一時期を過ごすことがある子座形成エ

表1. イネ科植物の主要なエンドファイトの種類

寄主植物	エンドファイトの属名	
	無性世代	有性世代
主として C <sub>3</sub> 植物	<i>Neotyphodium</i>	<i>Epichloë</i>
主として C <sub>4</sub> 植物	<i>Ephelis</i>	<i>Balansia</i>
		<i>Balansiopsis</i>
		<i>Atkinsonella</i>
		<i>Myriogenospora</i>

ンドファイト (*Epichloë* 属菌や *Ephelis* 属菌, それに *Balansia* 属菌などはこれに含まれる) である。*Neotyphodium* 属のエンドファイトはこれまで *Acremonium* 属に分類されていたが, 最近新属として分離した。非子座形成エンドファイトの *Neotyphodium* 属菌の有性世代は, 子座形成エンドファイトの *Epichloë* 属菌と考えられている。同様に, *Ephelis* 属菌の有性世代は *Balansia* 属菌と考えられていたが, 最近リボソーム DNA の塩基配列の比較から, これを否定する結果が得られた<sup>4)</sup>。これらのエンドファイトのなかには, 表2に示すように様々な有用機能を持ったエンドファイトが見

表2. イネ科植物の主要なエンドファイトと, それらの感染によって付与される有用機能

寄主植物	エンドファイトの種類	有用機能
ペレニアルライグラス	<i>Neotyphodium lolii</i>	耐虫性, 耐乾性, 収量の増加 (生育旺盛)
ペレニアルライグラス	<i>Gljiocladium</i> 様エンドファイト	耐虫性
トールフェスク	<i>N. coenophialum</i>	耐乾性, 耐虫性, 耐線虫性, 耐病性
トールフェスク	<i>Phialophora</i> 様エンドファイト	耐虫性
メドウフェスク	<i>N. uncinatum</i>	耐虫性
チューイングフェスク	<i>Epichloë typhina</i>	耐虫性
チモシー	<i>Epichloë typhina</i>	耐病性
スズメノヒエ	<i>Ephelis</i> sp.	耐虫性
<i>Panicum agrostoides</i> (キビ属の一種)	<i>Balansia cyperi</i>	耐虫性

つかっている。

## 2) エンドファイトの生活史

ペレニアルライグラスやトールフェスクなどの感染種子内にいる *Neotyphodium* エンドファイトの菌糸は、種子の発芽と同時に伸び始め、幼苗の生育にしたがって植物体内で伸展し、植物が種子を結実させると、菌糸も種子内へと伸展する。このように、エンドファイトは感染種子から植物へ、そこでまた種子に移行するという一生を送る (図 1)。このためエンドファイトは、感染種子を採種するだけで容易に殖やすことができる。またエンドファイト感染による耐病虫性などの付与は、植物が枯死するまで持続するという利点がある。子座を形成しないエンドファイトは、植物体内だけにおり、植物体内で胞子を形成することはない。このため自然界で他の植物に感染することはないと考えられている。

エンドファイトの菌糸は、植物体内のほとんどの部位で伸展している。ただし根だけは例外で、エンドファイトはほとんどいない。菌糸は植物細胞内に侵入することではなく、細胞と細胞の間隙 (図 2) や、稈や穂くびの髄腔面上を伸展している。エンドファイトの菌糸は、その周辺の植物細胞に加害を及ぼすことなく、植物から円滑に養分や水分の供給を受けているように見うけられた<sup>5,6)</sup>。

チモシーやチューイングフェスクなどでは出穂時に、エンドファイトは子座を形成する。チモシーでは初めに無性世代の分生子を形成し、その後、子のう胞子を形成するが、子のう胞子の感染については不明な点が多い (図 1)。チューイングフェスクでの有性世代は海外で報告されているが、わが国では確認されていない<sup>7)</sup>。この子座形成はがまの穂病と呼ばれ、この疾病に罹ると出穂しないため種子の収穫ができなくなるという被害がでる。このがまの穂病の病原菌は有性世代が *Epichloë typhina* で、無性世代は *Neotyphodium typhinum* である。チモシーではエンドファイトはこのようにながまの穂病として加害する反面、重要病害である斑点病<sup>8)</sup> や黒さび病<sup>9)</sup> に対して耐病性を付与することが明らかにされている。

一方、主として C<sub>4</sub> 植物では穂が *Ephelis* 属菌の子座によって被われる、いわゆるミイラ穂病が知られている<sup>10)</sup>。 *Balansia* 属菌では、子座が葉身や

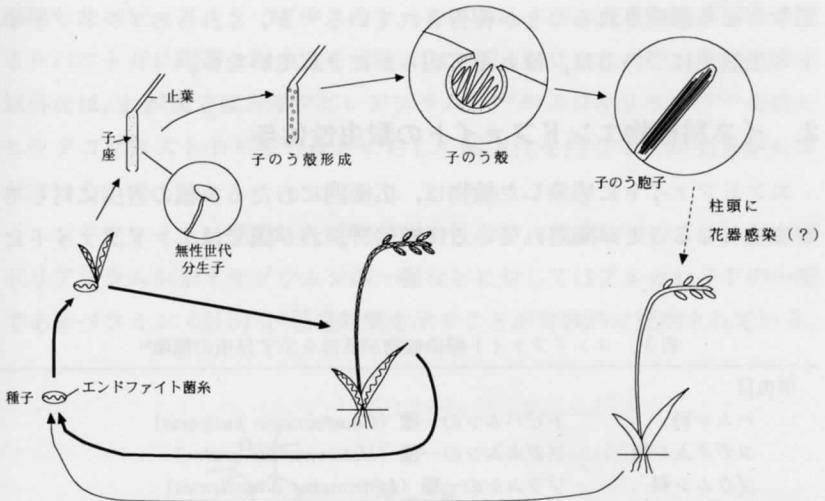


図1. エンドファイトの生活環

太い実線: *Neotyphodium* エンドファイトの生活環

細い実線: 子座形成エンドファイトの *Epichloë* の生活環

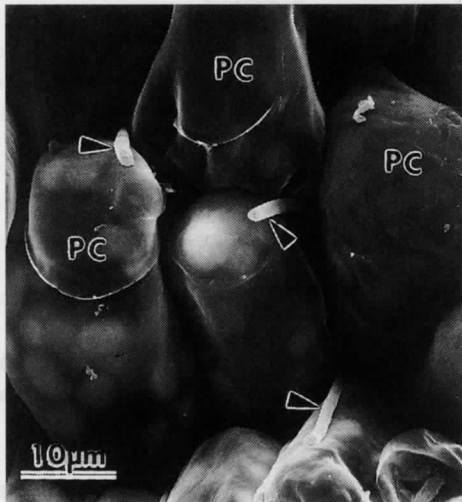


図2. ペレニアルライグラス葉身の葉肉組織の細胞間隙を伸展しているエンドファイトの菌糸 (矢印)

PC: 葉肉細胞

節などにも形成されることが報告されている<sup>11)</sup>が、これらのエンドファイトの生活史については、ほとんど明らかにされていない。

## 2. イネ科植物エンドファイトの耐虫性付与

エンドファイトに感染した植物は、広範囲にわたる多種の害虫に対して耐虫性となることが知られている (表3)<sup>12)</sup>。わが国ではエンドファイトに

表3. エンドファイト感染植物が活性を示す昆虫の種類<sup>a)</sup>

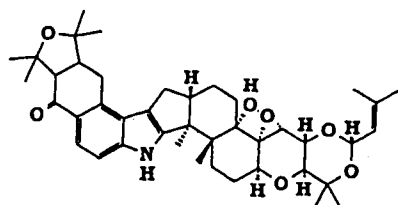
甲虫目	
ハムシ科	トビハムシの一種 ( <i>Chaetocnema pulicaria</i> )
コガネムシ科	コガネムシの一種 ( <i>Heteronychus arator</i> )
ゾウムシ科	ゾウムシの一種 ( <i>Listronotus bonariensis</i> )
オサゾウムシ科	オサゾウムシの一種 ( <i>Sphenophorus parvulus</i> , <i>Sphenophorus inaequalis</i> , <i>Sphenophorus minimus</i> )
	シバオサゾウムシ ( <i>Sphenophorus venatus</i> )
ゴミムシダマシ科	コクヌストモドキ ( <i>Tribolium castaneum</i> )
鱗翅目	
ヤガ科	カブラヤガ ( <i>Agrostis segetum</i> )
	ヤガ科の一種 ( <i>Graphania mutans</i> , <i>Spodoptera eridania</i> )
	ツマジロクサヨトウ ( <i>Spodoptera frugiperda</i> )
メイガ科	ウスギンツトガの近縁種 ( <i>Crambus</i> spp.)
	シバツトガ ( <i>Parapediasia teterella</i> )
半翅目	
異翅亜目	
	コナカイガラムシの一種 ( <i>Balanococcus poae</i> )
	ナガカメムシの一種 ( <i>Blissus leucopterus hirtus</i> , <i>Oncopeltus fasciatus</i> )
同翅亜目	
	ヒロズヨコバイの一種 ( <i>Agallia constricta</i> )
	オオヨコバイの一種 ( <i>Draeculacephala antica</i> )
	ヒメヨコバイの一種 ( <i>Endria inimica</i> )
	アブラムシの一種 ( <i>Diuraphis noxia</i> )
	ムギクビレアブラムシ ( <i>Rhopalosiphum padi</i> )
	ムギミドリアブラシ ( <i>Schizaphis graminum</i> )
直翅目	
	コオロギの一種 ( <i>Acheta domesticus</i> )

<sup>a)</sup> Latch (1993 年)<sup>12)</sup> を一部改変した。

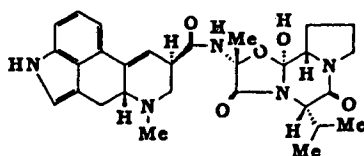


感染したペレニアルライグラスやトールフェスクが、芝草の重要害虫であるシバツトガに顕著な耐虫性を示すことが明らかにされた<sup>13)</sup>。シバツトガ以外には、わが国ではムギクビレアブラムシ<sup>14)</sup> やスジキリヨトウ<sup>15)</sup> それにヒラタコクヌストモドキ<sup>16)</sup> などに対して耐虫性を持つことが明らかにされている。

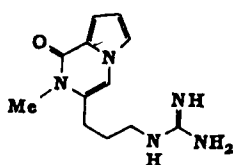
エンドファイトに感染した植物が耐虫性を持つ機構については、ムギミドリアブラムシやオサゾウムシの一種などに対してはアルカロイドの一種であるペラミン (図3) が忌避効果を示すことが実験的に証明されている。



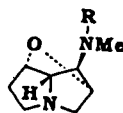
lolitrem B



ergovaline



peramine



R=Ac  
R=CHO

loline alkaloid

図3. エンドファイトに感染した植物に産生される家畜毒性アルカロイド (lolitrem B, ergovaline) と耐虫性アルカロイド (peramine, loline alkaloid)

またムギクビレアブラムシやオオヨコバイの一種などに対しては、ロリンアルカロイド(図3)が摂食阻害を起こすことが知られている<sup>2)</sup>。しかし、シバツトガに対する耐虫性物質については、現在のところ上述の既知物質と同一物質か否か明らかにされていない。

### 3. エンドファイトの人工接種による耐虫性付与

耐病虫性など有益な機能を持ったエンドファイトは、植物への人工接種に一旦成功すれば、その植物は枯死するまでその機能を発揮するものと考えられる。またすでに述べたように、その植物を結実させることによって、エンドファイト感染種子を容易に殖やすことができる。

エンドファイトの人工接種は、通常の植物病原菌で行われている方法では成功例がなく、現在のところ幼苗の分裂組織に菌体を付傷接種する方法<sup>17)</sup>とカルスに接種する方法<sup>18)</sup>で成功している。幼苗の分裂組織に、培地上で培養したエンドファイトの菌糸を付傷接種する方法でペレニアルライグラスとトールフェスクから分離したエンドファイトを非感染のそれぞれの植物に接種した結果、感染が認められ、それらはシバツトガに対して耐虫性を発揮することが確認された。また、この耐虫性は接種した世代だけでなく、採種した次の世代でも充分にその効果は持続されることが示された<sup>19)</sup>。ラフブルーグラスへのエンドファイトの人工接種によっても、シバツトガに対して耐虫性を付与できたと報告されている<sup>15)</sup>。

### 4. エンドファイトの人工接種における今後の研究課題

#### 1) 家畜毒性の問題

エンドファイトは耐虫性付与のような有益面と家畜中毒という有害面を持っており、牧草として利用する場合には家畜毒性が問題であった。しかし最近、家畜毒性物質としてロリトレム B (図3) とエルゴバリン (図3) が、耐虫性活性物質としてペラミン (図3) とロリンアルカロイド (図3) が単離され、化学構造が決定された。この一連の研究から、家畜毒性物質と耐虫性活性物質とは異なることが明らかとなった。そして、実際に家畜毒性がなく耐虫性活性のみあるエンドファイトが、自然界で見出されて

きた<sup>20,21)</sup>。現在、このエンドファイトを牧草に人工接種することによって、耐虫性の牧草を育成する研究が行われ、商品化が試みられている(Latch 私信)。

## 2) 人工接種時の特異性の問題

エンドファイトの人工接種はペレニアルライグラスやトールフェスクなど一部の植物に対しては成功している。しかし、わが国で主要な芝草であるベントグラス、コウライシバ、ノシバなどでは、エンドファイトは見出されていない。したがって、今後これらの植物に人工接種によってエンドファイトを、いかに感染させるかが課題となっている。この課題は植物とエンドファイトとの間に親和性・非親和性の特異性がある<sup>5)</sup> ことと深く関わっている。すなわちエンドファイトが本来の寄主に近縁の植物では、人工接種による感染も可能であるが、寄主と遠縁の植物では感染の可能性は低くなるであろう。したがって、ベントグラスに属のまったく異なるペレニアルライグラスやトールフェスクから分離したエンドファイトを接種しても、感染に成功する可能性は低いと考えられる。しかし、ベントグラスと同じ属である *Agrostis* 属の数種の植物にはエンドファイトが見つかったので、それらをベントグラスに人工接種すれば感染に成功する可能性は高い。最近、*Agrostis* 属植物から分離したエンドファイトをベントグラスへの人工接種に成功したとの報告がなされている<sup>22)</sup>。

エンドファイトを人工接種した時に被接種植物との間で起きる非親和性反応として、次のようなことが考えられる。

① 幼苗の分裂組織に接種しても、エンドファイトの菌糸がその部位からまったく伸展しないで死滅してしまう。

② 分裂組織で菌糸は伸展するが、それ以外の部位には伸展しないで死滅してしまう。

③ 被接種植物の若い組織では、エンドファイトの菌糸は伸展できるが、葉齢が進んだ組織では菌糸が死滅してしまう(図4-A, B)。エンドファイト菌糸と植物組織との接触場面透過電子顕微鏡で観察すると、親和性組み合わせでは、菌糸は細胞間質で被われ、植物と菌糸間に代謝産物の授受が活発に行われていることをうかがわせる。非親和性組み合わせでは、細胞間

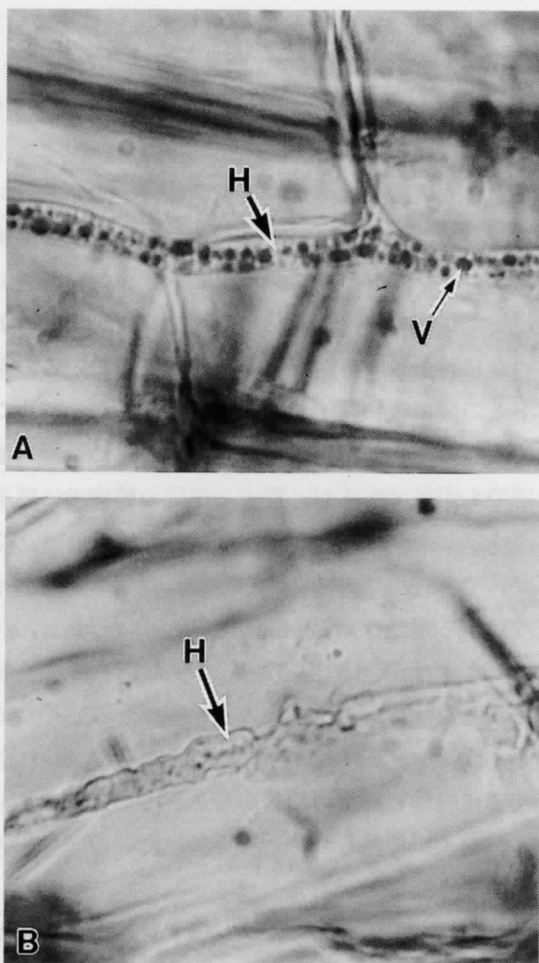


図 4. 植物組織内の *Neotyphodium* エンドファイト菌糸の中性赤染色による生死鑑別 (Koga *et al.* 1993<sup>5)</sup>)

A: 親和性組合せでは、菌糸 (H) 内の液胞 (V) が中性赤で染色されていることから、菌糸は生きていると判断される。

B: 非親和性組合せでは、中性赤で染色されていないことから、死滅していると判断される。

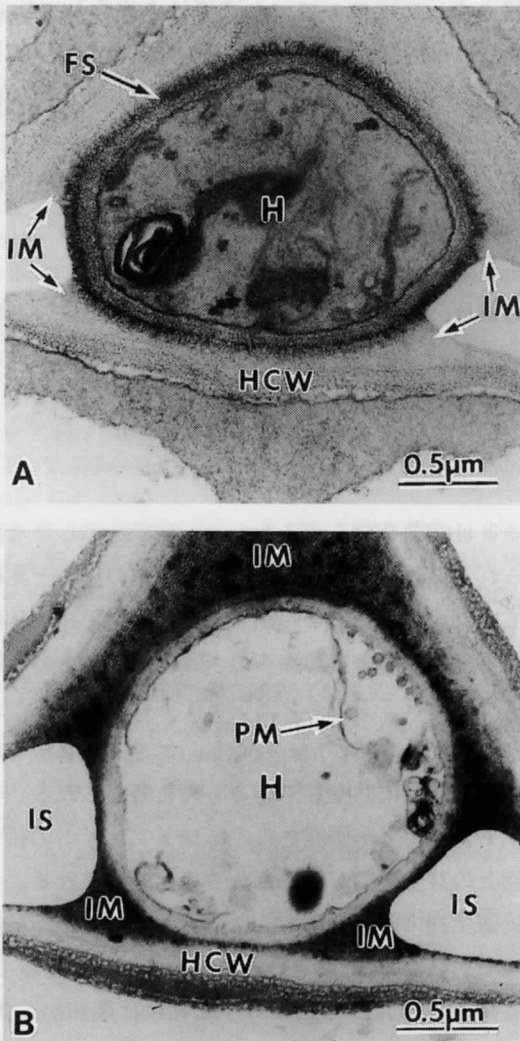


図5. *Neotyphodium* エンドファイト菌糸と植物組織の接触場面の透過電顕写真 (Koga *et al.* 1993<sup>5)</sup>)

A: 親和性組合せでは, 菌糸 (H) は細胞間質 (IM: intercellular matrix) で被われており, 菌糸の細胞壁の周囲に繊維状構造物 (FS) が観察され, 植物と菌糸間に栄養分や代謝産物の授受が活発に行われていることを示唆している。

B: 非親和性組合せでは, 細胞間質は高電子密度となって変性しており, 菌糸内の原形質膜 (PM) の断片化が起きている。HCW: 宿主細胞壁, IS: 細胞間隙

質は高電子密度となって変性しており透過性を喪失していると考えられる。また、菌糸内は原形質膜の断片化などが認められた (図 5-A, B)<sup>6)</sup>。

④ 人工接種によって一旦は全身に感染するが、数か月後には消失してしまう。

⑤ 感染したことによって、植物の生育が不良になる。この場合には、菌糸が通常の場合より多量に増殖することが知られている<sup>23)</sup>。

人工接種したエンドファイトが被接種植物と親和性になるか、それとも非親和性になるかは、究極的にはエンドファイトの遺伝子と植物の遺伝子との組合せによるものと考えられる。この特異性の解明に向けて、組織化学的、また分子遺伝学的な取り組みが望まれる。

## おわりに

エンドファイトは病徴を全く示さないか、病徴を示しても出穂期など特定の時期に限られることから、通常の植物病原菌の場合と比較して、研究が著しく遅れていた。しかし、この病徴を示さないで植物体内に共生しているという特質こそが、病虫害防除へのエンドファイトの利用に幸いしているともいえよう。これまでのエンドファイトの研究は主として寒地型の牧草・芝草などに限定されていた。しかし、エンドファイトは熱帯から寒帯までの多種多様の植物に共生しているものと考えられる。今後、さまざまな植物でエンドファイトが研究され、エンドファイトの持つ有益・有害機能と寄主植物との共生機構が解明されることが望まれる。

これまで拮抗微生物の研究が精力的に行われてきたが、「拮抗微生物は環境の影響を受けやすいため、それをいかに対象の植物に定着させるか？」という問題があった。この点エンドファイトは植物に最初から共生しており、定着の問題はないものと考えられる。今後、種々の病虫害に対して防除効果のあるエンドファイトが見つかるようになれば、少なくともその病虫害に対する農薬の使用は減らせ、環境保全にも貢献するものと期待される。

## 参考文献

- 1) Bacon, C.W., Porter, J.K., Robbins, J.D. and Luttrell, E.S. (1977) Appl.

- Environm. Microbiol. 34 : 576-581.
- 2) Siegel, M.R., Latch, G.C.M. and Johnson, M.C. (1987) Ann. Rev. Phytopathol. 25 : 293-315.
- 3) Fletcher, L.R. and Harvey, I.C. (1981) New Zealand Vet. J. 29 : 185-186.
- 4) 田中栄爾・川崎茂樹・田中千尋・月星隆雄・彭 友良・津田盛也 (1999) 日植病大会講要 p. 194.
- 5) Koga, H., Christensen, M.J. and Bennett, R.J. (1993) Mycol. Res. 97 : 1237-1244.
- 6) Koga, H., Kimigafukuro, T., Tsukiboshi, T. and Uematsu, T. (1993) Ann. Phytopathol. Soc. Japan. 59 : 180-184
- 7) 古賀博則・月星隆雄・植松 勉・島貫忠幸・但見明俊 (1999) 草地試研報 57 : 27-34.
- 8) 島貫忠幸 (1987) 北海道農試研報 148 : 1-56.
- 9) 但見明俊 (1991) 植物防疫 45 : 106-108.
- 10) Koga, H., Tsukiboshi, T. and Nakayachi, O. (1999) Bull. RIAR. Ishikawa Agr. Coll. 6 : 53-60.
- 11) Koga, H., Kelemu, S. and Sanchez, M.S. (1995) Plant Disease 10 : 1074.
- 12) Latch, G.C.M. (1993) Agric. Ecosyst. & Envir. 44 : 143-156.
- 13) 神田健一・平井剛夫・古賀博則・長谷川一夫 (1994) 応動昆 38 : 141-145.
- 14) 神田健一・古賀博則・平井剛夫 (1992) 関東東山病虫研報 39 : 191-192.
- 15) 篠崎 聡 (1998) 芝草と品種, ソフトサイエンス社 p 90-99.
- 16) 吉松慎一・有村一弘・島貫忠幸 (1998) 応動昆 42 : 227-229.
- 17) Latch, G.C.M. and Christensen, M.J. (1985) Ann. Appl. Biol. 107 : 17-24.
- 18) Johnson, M.C. and Siegel, M.R. (1986) Plant Disease 70 : 380-382.
- 19) Koga, H., Hirai, Y., Kanda, K., Tsukiboshi, T. and Uematsu, T. (1997) JARQ 31 : 109-115.
- 20) Latch, G.C.M. and Tapper, B.A. (1988) Assoc. Mycotox., Suppl. 1 : 220-223.
- 21) Siegel, M.R., Latch, G.C.M., Bush, L.P., Fannin, F.F., Rowan, D.D., Tapper, B.A., Bacon, C.W. and Johnson, M.C. (1990) J. Chem. Ecol. 16 : 3301-3315.
- 22) Sun, S. and Brede, A.D. (1997) International Turfgrass Soc. Res. J. 8 : 925-929.
- 23) Christensen, M.J., Ball, O.J.-P., Bennett, R.J. and Schardl, C.L. (1996) Mycol. Res. 101 : 493-501.





# イネ科植物に共生する エンドファイトの探索

篠 崎 聡

## 1. はじめに

エンドファイトとは、イネ科植物に共生する糸状菌の総称で、ここではグラスエンドファイトとよばれる *Neotyphodium* 属エンドファイトを示す。エンドファイトに感染、共生している宿主植物は、耐虫性、耐病性、環境ストレス耐性を示すことが知られているが、その反面、生産するアルカロイドが家畜毒性を生じる原因として報告されている。エンドファイトは、イネ科の牧草や芝草での研究が進んでおり、その生産するアルカロイドや耐虫性機構が報告されている。

C3 イネ科植物の多くには、エンドファイトが共生しており、世界各地に分布している。日本でも、北海道から九州までエンドファイトが分布している。このエンドファイトの生活環は、種子を通じて後代へ伝播する性質を有するため、宿主植物とエンドファイトの共生は、非常に重要であり、種が異なる宿主への感染、共生は非常に稀である。また、C4 イネ科植物では、*Ephelis* 属などのエンドファイトが存在しているが、これらのエンドファイトは出穂期にミイラ穂とよばれる病徴を示すことで知られている。

ここでは、*Neotyphodium* 属エンドファイトの日本国内での探索とその検出方法及び、これらのエンドファイトを利用した耐虫性芝草の開発に関して紹介する。

## 2. エンドファイトの探索と検出

エンドファイトは、宿主植物の細胞間隙に存在するため、外見からはエ

エンドファイトの有無は識別できない。そこで、一般的には、植物の組織を剥ぎ取り、これをアニリンブルーなどの染色液で染色した後、光学顕微鏡で観察する方法が用いられる。図1が細胞間隙中のエンドファイトの菌糸を示したものである。また、顕微鏡による観察が困難な植物では、エンドファイトを抗体に用いた ELISA 法によって、植物体から検出を行った。この手法は簡便かつ、組織が固いイネ科植物には有効な手法である。具体的には、エンドファイトの菌糸を抗原として、ウサギを用いて抗血清を作製し、植物抽出液を試料として、反応させ、2次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識酵素で反応させ、マイクロプレートリーダにて 450 nm の波長を検出した。

筆者らは、日本各地からイネ科植物を収集し、これまでに 1,000 系統を超えるエンドファイトを収集分離した。これまでに検出されたエンドファイトの宿主植物は、ウシノケグサ属、イチゴツナギ属、イブキヌカボ属、ドジョウツナギ属、コメガヤ属、ホガエリガヤ属、ヌカボ属、アワガエリ属、スズメノチャヒキ属、ヤマカモジグサ属、エゾムギ属などであり、自生植

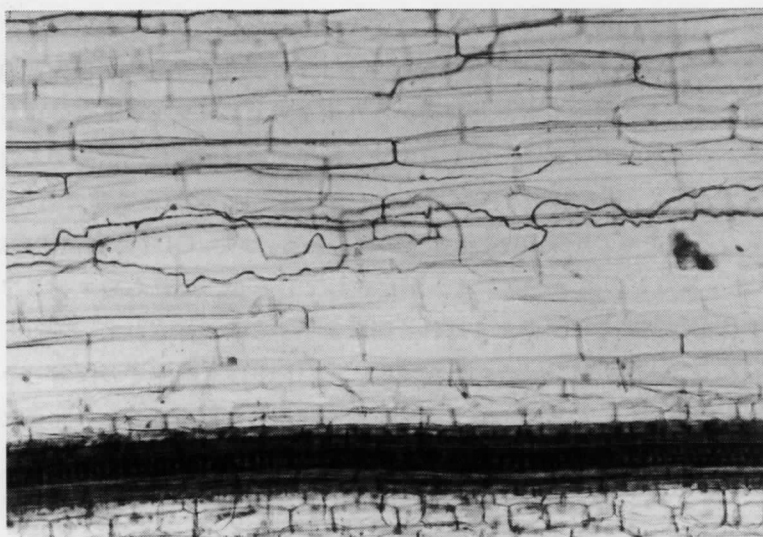


図1. 植物細胞間隙に存在するエンドファイトの菌糸  
(写真の中央の線が染色された菌)

物から帰化植物まで分布している。これらの植物は、遺伝資源として圃場、温室にて管理する一方、分離培養したエンドファイトを保存している。

エンドファイトの分離は、強めの滅菌条件で植物組織を滅菌して、これを PDA 培地にて培養することで可能である。表面の雑菌は殺菌されるような条件が必要である。また、培地上でのエンドファイトの生育は、非常に遅く、高温を避けた培養が要求される。また、エンドファイトは種子のこふん層に存在するため、種子中の保存も可能であるが、長期保存では低温、乾燥条件が必要である。

### 3. エンドファイトの生産するアルカロイドなどの天然物

エンドファイトは、耐虫性物質としてペラミン (peramine) やロリン (loline), 家畜毒性物質としてエルゴバリン (ergovaline) やロリトレム (lolitrem) を生産している。これらの物質は、植物が動物や昆虫などからの食害を防ぐことに利用されており、エンドファイト非感染植物に対して感染植物が生存していく上で大きな利点となる。植物にとっては、エンドファイトを共生させることで、これらの形質を獲得することが可能になる。従って、劣悪な環境条件下で植物が生育する際に、大きなアドバンテージとなる。

これらのアルカロイドは、全てのエンドファイトが生産するものではなく、一部の系統では、ペラミンのみを生産するものが存在する。このエンドファイトはエンドセーフ (endo-safe) と呼ばれ、耐虫性を示す一方、家畜に毒性を示さない特徴から、有用なエンドファイトである。これは、既にペレニアルライグラスからニュージーランドの研究者らによって、スクリーニングされ、特許化されている。

筆者らは、エンドセーフの探索と耐虫性物質の探索のため、アルカロイドの分析を行っている。用いた試料は、収集したエンドファイト感染植物及び人工的に接種した植物を供試した。ペラミンは、Rowan (1989) らの手法により、抽出、精製し、逆相 HPLC にて検出した。また、ロリン類は、Yates (1990) らの手法により、抽出、精製し、キャピラリーGC にて検出した。また、エルゴバリンは、Rottinghaus (1991) らの手法により、抽出、

精製し、逆相 HPLC の蛍光検出器にて検出した。

ペラミンは、供試した多くの植物から検出され、日本のエンドファイト感染植物に普遍的に存在していることが判明した。また、ロリン類は、MS 分析の結果、構造が決定したが、個体による差異が観察された。生産していない植物も観察された。また、エルゴパリンを含むエルゴペプチンは、現在、構造を同定中であるが、やはり、個体間に差異が見られた。また、エルゴペプチンは濃度が非常に低く、検出が困難なものが多かった。これは、植物が熱ストレスにさらされたときに生産することが知られており、日本の環境下では、生産量が低い事が予想される。

現在は、研究開発途中であるが、エンドセーフ探索の可能性が見えてきた。また、大量にサンプルをスクリーニングする際には、簡易的に検出する手法が不可欠である。そこで、現在は、アルカロイドの抗体を作製し、ELISA による検出方法を試みている。

#### 4. エンドファイトの人工接種による芝草への耐虫性の付与

エンドファイトの宿主認識は、非常にタイトでほとんどの場合、宿主が異なるとエンドファイトは生存できない。また、エンドファイトの植物への感染能力は非常に低く、接種方法も通常の病原菌の手法と異なる。従って、一般的にはこれまでにエンドファイトの存在しない植物への導入は難しい。

芝草の分野では、ペレニアルライグラスやトールフェスクなどの一部の植物では、既に自然界でエンドファイトが存在している。従って、新しい品種などへの導入は、交配や接種によって可能である。交配の場合は、母系の種子を回収すれば、感染種子を回収できる可能性がある。しかし、エンドファイトが存在しない有用な芝草であるケンタッキーブルーグラスやベントグラスでは、エンドファイト感染種子が流通していない。これは、これらの植物に共生しうるエンドファイトが発見または開発されていないためである。欧米の大学や種苗企業では、これらの菌の探索が精力的に推進されている。

筆者らは、探索したエンドファイトから栽培芝草品種であるラフブルー

グラスへのエンドファイトの導入に成功した。以下にその実施例と効果を示すことにする。

ラフブルーグラス (*Poa trivialis*) は、日本では使用例が少ないが、米国などでは冬場のグリーン用の芝として人気がある。接種に使用したエンドファイトは収集したエンドファイトであり、総当たりの接種を行った。供試したラフブルーグラスの種子は、流通品種セイバー (Sabre) で、表面殺菌の後、寒天培地に播種し、25°C、暗黒条件で無菌的に発芽させた。発芽後、幼植物をクリーンベンチ内で成長点にメスで傷をつけスリットを作り、分離培養したエンドファイトの菌糸を挿入した。接種後に、植物は暗黒条件および照明条件で培養した後、順化し、温室で育成した後、顕微鏡によって感染を確認した。人工接種の流れを図2に示した。接種の結果、FERM-15862のエンドファイトが植物に感染することが判明した。

この感染植物は順調に生育し、圃場で開花後に種子を結実した。この種子にはエンドファイトが感染しており、後代への伝播が証明された。現在は2代目以降のの植物も感染が確認されている。さらに、ラフブルーグラスのその他の品種でも人工接種による感染が可能であり、品種間の差異なく感染する菌であることが判明した。

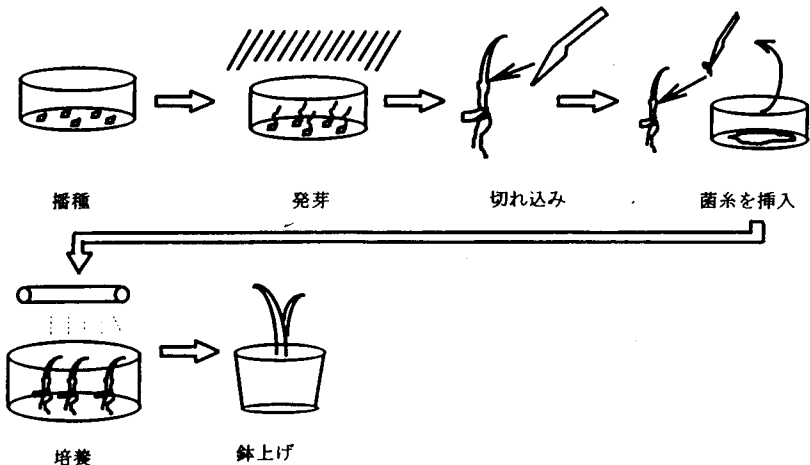


図2. 人工接種方法の流れ



図3. エンドファイト感染芝草の圃場検定結果

このエンドファイト感染植物を栄養繁殖させ、圃場にて耐虫性などの検定を行った。静岡県富士宮市の実験圃場では、1997年の夏に芝草の主要害虫であるシバツトガが発生し、エンドファイト感染個体のみが食害を受けずに、芝の品質を維持できた。圃場検定の結果を、図3に示した。

現在、この耐虫性のメカニズムについて調査しているが、これまでにカノクラビン (chanoclavine) が HPLC で検出されている。しかし、ペラミンは検出されておらず、その他のアルカロイドについては現在分析中である。耐虫性のメカニズムの解明が期待される。

このエンドファイト感染ラフブルグラスは、米国にて評価試験を計画しており、近い将来、米国を中心とした世界各地で利用されることが期待される。

## 5. 今後の展望

エンドファイト技術による生物防除は、化学農薬に替わる技術として、注目されている。しかし、主要芝草への導入が難しいことや、エンドセーフ

の開発などまだ、超えなければならないハードルが数多くある。また、基礎的な研究が遅れており、植物とエンドファイトの共生機構や相互作用、ケミカルコミュニケーションなど研究テーマは山積みである。今後は、植物や、病理の研究者に加え、天然物化学、分子生物など多方面にわたる研究者のプロジェクト研究が必要であると感じている。今後、エンドファイトに関して興味を持っていただければ、幸いである。なお、本研究の一部は社団法人日本飼料作物種子協会の委託事業である「スーパーグラス開発促進事業」によって実施された。

### 参考文献

- D.D. Rowan, et al (1989), J. Chromat., 463, 133-138  
 S.G. Yates, et al (1990), J. Agric. Food Chem., 38, 182-185  
 G.E. Rottinghaus, et al (1991), J. Agric. Food Chem., 39, 112-115  
 M. Shimaie, et al (1996), First World Cogress on Allelopathy, 236  
 S. Shinozaki, et al (1998), International Congress Plant Pathology, 2-9-15  
 山島佐知子, 篠崎 聡 (1997), 農芸化学講演要旨集, 74  
 比留間直也, 篠崎 聡 (1996), 育種学雑誌, 46(2), 167





# 野生イネおよび栽培イネ在来品種の エンドファイトの探索

南 沢 究

---

## はじめに

近年、野生植物体内に内生している細菌や菌類などの存在がしだいに明らかにされ、植物に耐虫性、耐病性、生育促進、窒素固定などの有用機能を与えている場合のあることが明かになりつつある。従来、植物に内生している微生物の研究は、根粒菌・菌根菌・根圏微生物など、土壤と接する根部を中心として行われてきたが、植物体地上部の内生微生物(エンドファイト)に着目した研究は、植物病原菌の分野を除いてほとんど行われていない。作物化された植物は、肥料や農薬の施用を前提とした栽培化によって、本来の内生微生物が失われた可能性も考えられた。そこで、従来検索の対象となっていない野生イネおよび栽培イネ在来品種を対象にこれらの内生微生物の探索を行った。

イネはアジアを中心とした世界の主要穀物の一つであり、人間による長い栽培化の歴史がある。栽培イネ(*Oryza sativa*)の生態型として、日本型、インド型、ジャワ型(熱帯日本型)が知られているが、ジャワ型は東南アジアの焼畑などの劣悪な環境下における粗放的な栽培に適している栽培在来品種のグループである。野生イネは、東南アジアからオーストラリア、アフリカ、南米、中米にかけて、沼沢地、低湿地あるいは半陰地に自生する *Oryza* 属の野生種である<sup>1)</sup>。

## 1. 野生イネおよびジャワ型イネに内生している微生物の単離 同定

東北大学遺伝生態研究センターで維持されている、野生イネおよびジャワ型イネの主に茎に内生している微生物の単離同定を行った。植物サンプルをエタノールおよび次亜塩素酸ナトリウムまたは次亜塩素酸カルシウムで十分表面殺菌した後、無菌的に分割した試料を PDA 培地上に置き、生育してくる細菌や糸状菌を分離した。単離された細菌は、細菌の分類の重要な指標であるグラム染色によって、グラム陽性および陰性の判定および形態の観察を行った。次に、細菌細胞のライゼート調製し、それをテンプレートとして 16S rRNA 遺伝子の部分配列を決定し、FASTA プログラムを用いて DNA データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) と相同性検索を行った。進化系統樹は、ClustalW を用いて近隣結合法で行った。生育の遅い糸状菌は、抗 *Acremonium* 抗体による ELISA 分析を行った。また、酵母様の真核生物については、18S rRNA 遺伝子の部分配列の決定を同様に行った。

単離された細菌の 16S rRNA 遺伝子の部分配列に基づいた系統樹を図 1 に示した。概観すると、かなり広い分類群の細菌が認められたが、 $\alpha$ -*Proteobacteria* と High G+C Gram positive に多く分布していることが特徴的であった。三井・服部らが、水田土壌から培養法で分離した細菌では、 $\beta$ -*Proteobacteria* および Low G+C Gram positive に属する細菌も比較的多数見出し出されているが、野生イネおよびジャワ型イネの茎葉に内生していると考えられる今回の分離菌にはほとんど見出し出されなかった<sup>2)</sup>。

グラム陰性の  $\alpha$ -*Proteobacteria* は、根粒菌・*Agrobacterium*・*Azospirillum* など植物と関係の深い細菌が含まれているが、今回のイネからの単離細菌は、*Methylobacterium* 属細菌の出現頻度が高く (図 1)、多数の野生イネおよびジャワ型イネから分離された (表 1)。また、 $\alpha$ -*Proteobacteria* に属する単離細菌として、葉面細菌である *Sphingomonas* や根圏の生育促進菌である *Azospirillum* に近縁なものが、 $\beta$ -*Proteobacteria* では、サトウキビに内生している窒素固定細菌 *Herbaspirillum* に近縁な細菌が、少数なが

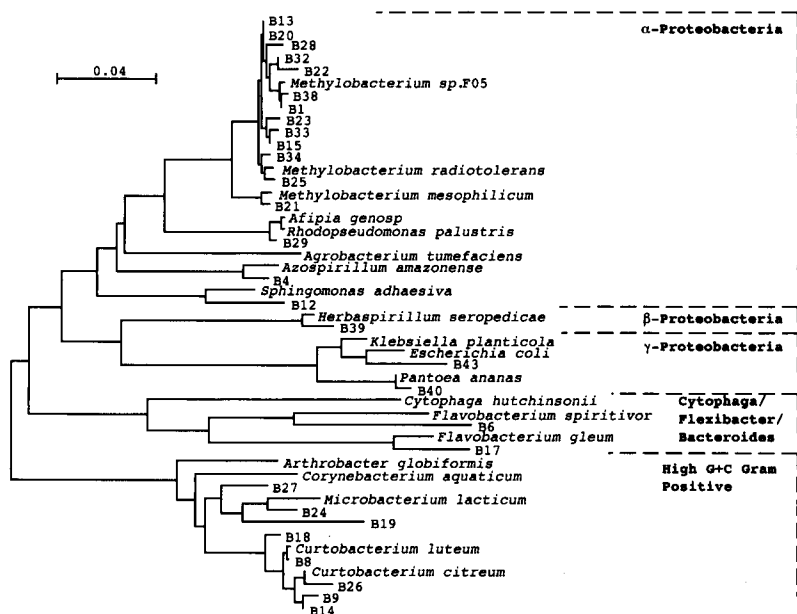


図1 野生イネおよび栽培イネ在来品種に内生している細菌の16S rDNA 遺伝子部分配列に基づいた系統樹

ら分離されていることは興味深い。グラム陽性菌では、*Curtobacterium* が多数の野生イネおよびジャワ型イネから単離されていた (図1, 表1)。

## 2. 分離頻度の高い *Methylobacterium* 属, *Curtobacterium* 属細菌

*Methylobacterium* 属細菌は、自然環境や都市環境に広く分布し、ピンク色を呈するグラム陰性菌で、メタノールなどの C1 化合物を炭素源として生育する。*Methylobacterium* は、ワタやトウモロコシの組織に内生菌として<sup>3)</sup>、また、組織培養の際の除去しにくいコンタミ菌としても見い出されており<sup>4)</sup>、その機能はよくわかっていないが植物の内生する能力があるのではないかと考えられる。また、*Methylobacterium organophilum* は、様々な炭素化合物と同時にメタンを炭素源やエネルギー源として生育可能である<sup>5)</sup>ので、今回イネから分離された *Methylobacterium* 属細菌も、そのよう

表1 野生イネおよび栽培イネ在来品種から分離された  
*Methylobacterium* 属, *Curtobacterium* 属細菌

Close relatives (homology) <sup>1)</sup>	Color on PDA	Origin	
		Organ	Species
<i>Methylobacterium</i> sp. (97–99%) <sup>1)</sup>			
B1	Red	Stem	<i>O. sativa</i>
B13	Red	Stem	<i>O. longiglumis</i>
B15	Red	Stem	<i>O. brachantha</i>
B20	Red	Stem	<i>O. sativa</i>
B21	Red	Stem	<i>O. sativa</i>
B22	Red	Leafsheath	<i>O. sativa</i>
B23	Red	Stem	<i>O. officinalis</i>
B25	Red	Stem	<i>O. latigfolia</i>
B28	Red	Stem	<i>O. longiglumis</i>
B32	Red	Stem	<i>O. rufipogon</i>
B33	Red	Stem	<i>O. minuta</i>
B34	Red	Stem	<i>O. rufipogon</i>
B38	Red	Stem	<i>O. rufipogon</i>
<i>Curtobacterium citreum</i> (98–99%) <sup>1)</sup>			
B 8	Yellow	Stem	<i>O. sativa</i>
B 9	Yellow	Stem	<i>O. eichingeri</i>
B14	Yellow	Stem	<i>O. longiglumis</i>
B18	Yellow	Stem	<i>O. rufipogon</i>
B26	Yellow	Stem	<i>O. punctata</i>

<sup>1)</sup> 16S rRNA 遺伝子の部分配列 (約 500 kb) の相同性

な能力があるか否か検討を行っているところである。

*Curtobacterium* 属細菌は、最初、駒形<sup>6)</sup>らが中国米の種子より分離し、その後、じゃがいもダイズ、トウモロコシなどの植物体から分離され、*Erwinia* による軟腐病に対する耐病性<sup>7)</sup>や生育促進をおこす内生菌<sup>8)</sup>として報告されている。また、*Curtobacterium* は、 $\beta$ -Glucuronidase 活性を持っており、内生菌として *Curtobacterium* が感染している形質転換植物で偽りのシグナルを与えることが報告されている<sup>9)</sup>。ちなみに、今回イネから分離された *Curtobacterium* 属細菌もすべて  $\beta$ -Glucuronidase 活性を示した。*Azopsirillum* 属細菌は、コロナイズするための多糖を菌体外に分泌し、

コンゴーレッドを吸収するが、今回単離された *Curtobacterium* 属細菌も同様にコンゴーレッド吸収能を示した。したがって、*Curtobacterium* 属細菌は、植物体内に好んで生息するグラム陽性細菌であると考えられる。

### 3. イネに内生するその他の微生物

本研究を開始した一つの動機は、野生イネ科植物に感染していることが知られている *Neotyphodium* や *Balansia* などの糸状菌エンドファイトが、イネ属 (*Oryza* 属) にも見いだされないであろうかという疑問であった。イネの茎葉部や種子からは生育の遅い糸状菌が多数単離されたが、ペレニアルライグラスやトールフェスクに感染しているタイプの *Neotyphodium* や *Balansia* は、今のところ見つかっていない。

複数の野生イネから、酵母状の真核生物が単離されたので、18S rRNA 部分配列で同定を試みたところ、クロボ菌類に近縁な担子菌系の酵母であった。一般に、クロボ菌類は病原菌として知られているが、単離された野生イネは特に病兆は示していないので、いわゆるエンドファイトの範疇に入ると考えられた。パキスタンに自生している Kallar grass という植物は肥沃でない高塩土壤にパイオニア植物として生育しているが、Kallar grass には  $\beta$ -*Proteobacteria* に属する *Azoarcus* という窒素固定菌が内生している。面白いことに、*Azoarcus* はイネから分離されていないが、クロボ菌類の菌核を住みかにしてイネにも定着している可能性が指摘されている<sup>10)</sup>。いわゆる三者共生である。やはり、内生微生物を広くかつ関連づけて見ることも重要性であると感じられる。

### 4. イネ地上部に生息している窒素固定細菌

1970年代から、イネ根圏における窒素固定菌の研究がフィリッピン国際イネ研究所および国立遺伝学研究所を中心として開始された。これは、土壤中に生息する遊離の窒素固定細菌が、イネの根から炭水化物などのエネルギー源を受け取り、固定した窒素化合物をイネに渡すという内容で、「ゆるい共生窒素固定」または「協同的窒素固定」と言われている<sup>11)</sup>。イネ根圏の窒素固定菌として、*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Azospirillum*,

*Pseudomonas* 属細菌が同定されてきた。しかし、イネ地上部の窒素固定の重要性について指摘されながらも<sup>12)</sup>、本格的な探索は行われてこなかった。そこで、野生イネの茎から Rennie の半流動培地による希釈法によって、窒素固定菌の単離を行ってみた。その結果、国立遺伝学研究所でイネ根圏から分離たされた *Klebsiella oxytoca* NG13 株 (59 nmol/hr/tube) と比較して高い窒素固定活性を示す *Azospirillum* 属と近縁な B52 株と *Herbaspirillum seropedicae* と非常に近縁な B65 が野生イネの茎から単離された (表 2)。B52 株は、根圏から分離された *Azospirillum lipoferum* と比較して、培地上の生育や表現型が多少異なっていた。以前、Watanabe ら<sup>12)</sup> がイネ地上部から単離され、*Spirillum*-like bacteria と記述していたものと近いかもしれない。*Herbaspirillum seropedicae* は、*Acetobacter diazotrophicus* とともに、サトウキビなどの糖を集積する植物の茎や葉に内生している窒素固定細菌で、土壌中には生息せず、植物の栄養体や種子で伝播するとされている<sup>13)</sup>。*Herbaspirillum* spp. は、イネ科植物の地上部からも発見されている、トウモロコシの場合は病原菌である可能性が指摘されている<sup>13)</sup>。窒素固定には、多量のエネルギーが必要であり、イネの生育ステージにともな

表 2 野生イネから分離された窒素固定細菌

Close relatives (homology)	Surface sterili- zation	Origin		ARA*
		Organ	Species	
<i>Azospirillum lipoferum</i> (95%)				
B52	No	Shoot	<i>O. glandiglumis</i> W1194(CCDD)	135
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> (98%)				
B65	No	Leaf sheath	<i>O. barthii</i> W1407 (AA)	113
<i>Azospirillum amazonense</i> (95%)				
B4	Yes	Stem	<i>O. alta</i> W0018(CCDD)	33
<i>Afipia genosp</i> (98%)				
B29	Yes	Stem	<i>O. ridleyi</i> W0001	0.5

\* Rennie の半流動培地を用いてアセチレン還元活性 (nmol/hr/tube) 測定した。

う糖や有機酸レベルの変動に大きく依存しているはずである。この点については、1970年代から指摘されているが、地上部に内生しているエンドファイトを意識した研究は見当たらない。

## 5. イネに内在する微生物の探索のアプローチ

今までは、野生イネおよび栽培イネ在来品種の地上部および種子などから多数の微生物を単離し、その同定を行うという極めて単純な探索を行ってきたが、上述のようないくつかの興味深い、示唆的な結果を得てきた。その間、イネのエンドファイト研究をどのように進めると面白いかという点について、いろいろな専門の研究者と議論してきた。ここで、私見も交えながらそれらの論点をまとめてみたい。

### 1) 有用な微生物遺伝資源としての位置付け

イネに内生または表面に生息している微生物の種類は、思いのほか多様であった。他の植物の場合も同様で、これらの植物の環境に適応した微生物は、将来の有用物質生産などのための貴重な材料になるという捕え方である。ここで、単離されてきた微生物は、植物と強い相互作用を起こしている場合から、ただ単に腐生的な生活をしているものまで連続的なものであろう。研究手法の難しさはさておいて、やはり、何故その植物に、その微生物が生息していたのか知りたくなるであろう。

### 2) 根粒菌や *Agrobacterium* など明らかにされている植物微生物相互作用との比較

本冊子の前半部分は、根粒菌を中心とした共生成立のために、フラボノイドやリポキチンオリゴサッカライドといった化学シグナルを介した両パートナー間の遺伝子発現制御が最も重要であることを明らかにしている。しかし、最近の研究では、これらの系は、なにも根粒菌とマメ科植物に限られたことではなく、それぞれの生物がもっている自身の信号系を再統合して利用している姿が明らかになりつつある。また、*Agrobacterium* などの病原菌も含めると、図2に示したように様々な因子がそれぞれの共生系に特有な形で関わっていることが予想される。イネエンドファイトの中にも、両パートナー間で色々な働きかけのあるものと予想され、エンド

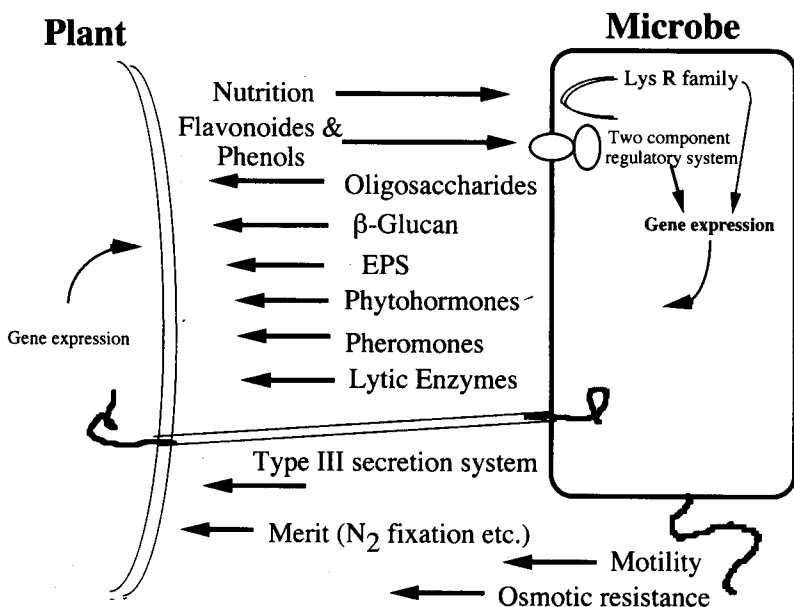


図2 根粒菌や *Agrobacterium* の研究で植物と微生物の相互作用に関わっていることが知られている因子

ファイトの定着や特異性に関与しているのではないだろうか。また、今回の結果からも、文献的にも、エンドファイトは植物体内で、潜在的に病原菌として振る舞う可能性を秘めており、おそらく病原性の機構とも接点をもつと考えられる。

### 3) 生理・生態学的な興味

微生物生態学の立場でみると、植物体内のエンドファイトの群集構造がイネの生育にしたがってどのように変化して行くかが重要な関心事になる。イネは登熟前に茎や葉鞘に糖をためこむ性質を持っているが、それがエンドファイトの基質になると思われる。イネ籾にはモミラクトンなどの多量の抗菌物質が含まれ、また、野生イネはみな赤米であり、種子を微生物からの攻撃に対して保護しているが、エンドファイトはどのようにイネ種子に入り込むのであろうか。エンドファイトが植物に内在あるいは定着する機構はいかなるものであろうか。*Azoarcus* 属細菌で示唆されている三



者共生，すなわち，エンドファイト同志の相互作用はいかなるものであろうか。以上のような疑問がわいてくる。

今後は，上述のような観点も含めて，研究を進めて行きたいと考えている。最後に，貴重な助言を下さった，静岡大学の佐藤洋一郎氏，立命館大学の森崎久雄氏，東北大学農学部の前 忠彦氏に深謝いたします。本研究は，東北大学遺伝生態研究センターの西岡きよ氏，Adel Elbertagy 氏，佐藤雅志氏，三井久幸氏，鈴木 永氏の協力を得て行いました。

## 参考文献

- 1) 稻学大成第3巻 遺伝編 松尾孝嶺編，農山漁村文化協会，1990
- 2) 三井久幸 土壤細菌群集の多様性の解析による遺伝生態カタログ化，IGE シリーズ 23 遺伝生態情報の可能性 p. 49-66 東北大学遺伝生態研究センター
- 3) MacInroy, J.A and Kloepper, J.W. (1995) Plant Soil. 173: 337-342.
- 4) Sermsi, C. et al. (1996) Plant Cell Reports, 16: 222-225.
- 5) Hanson, R.S. and Hanson, T.E. (1996) Microbiol. Rev. 60: 439-471.
- 6) 駒形和男，飯塚 広 (1964) 農化，38: 496-502.
- 7) Sturz, A.V. and Mattheron, B.G. (1996) Plant Soil 184: 256-271.
- 8) Sturz, A.V. et al. (1997) Biol. Fertil. Soil 25: 13-19.
- 9) Tor, M. et al. (1992) Plant Cell Reports 11: 452-456.
- 10) Hurek, T. et al. (1997) Appl. Environ. Microbiol. 63: 4331-4339.
- 11) 米山忠克，赤尾勝一郎 (1998) 土肥誌 69: 403-409.
- 12) Watanabe, I. et al. (1981) Plant Soil 59: 391-398.
- 13) James, E.K. and Olivares, F.L. (1997) Critical Reviews in Plant Sciences 17: 77-119.



# 有用根圏菌類による病害抑制： 植物生育促進菌類と菌根菌

百 町 満 朗\*

近年、減農薬・生態系保全型の病害防除の必要性が強く唱えられているが、そうした中で環境負荷の影響が少ないと考えられている生物防除の研究が、世界的にも精力的に進められている。これまでに有望な生物防除要員が多様な機能をもつ微生物の中から探索されてきている。植物の根や根圏から分離される細菌や菌類の中には植物の生育を顕著に促進するものがあり、それぞれ植物生育促進根圏細菌 (plant growth-promoting rhizobacteria: PGPR)<sup>1-4)</sup>、植物生育促進菌類 (plant growth-promoting fungi: PGPF)<sup>5-17)</sup> と呼ばれている。有用根圏微生物であるこれら PGPR や PGPF は植物の生育を促進するのみならず、各種の土壤病害を抑制することも知られている<sup>1,3-7,9-11,13-23)</sup>。また、同様な効果が植物の根に共生する菌根菌によっても見いだされている。また、最近では PGPR や PGPF さらには菌根菌が土壤病害に加えて地上部病害をも抑制するという興味深い事実が明らかになってきている<sup>24-37)</sup>。すなわち PGPR や PGPF および菌根菌の病害抑制機構に植物への全身抵抗性の誘導が関わっていることが見いだされてきており特に注目されている。これまで PGPR に関しては植物に対する生育促進機構や病害抑制機構に関する研究が精力的に行われてきているが、PGPF や菌根菌におけるこれらの研究はまだ萌芽的な状態にすぎない。ここでは、有用根圏菌類として PGPF と菌根菌を中心に、植物に対する生育促進機構や病害抑制機構に関するこれまでの研究例を紹介する。

## I 植物の生育を促進する有用根圏菌類の例

これまでに報告されている植物の生育を促進する有用根圏微生物として

は、細菌では *Agrobacterium paspali*, *Azotobacter putida*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas fluorescense*, *P. putida*, *Streptomyces* sp.<sup>40-46)</sup> が、また菌類では *Fusarium roseum*, *Phytophthora parasitica*, 非病原性 *Rhizoctonia solani*, 2 核 *Rhizoctonia* AG-F, AG-K, *Rhizopus nigricans*, sterile black fungus, sterile dark fungus, sterile red fungus, *Trichoderma koningi*, *T. viridae*, *T. harzianum* 等が知られている<sup>5,6,7,11-13,17,47-49)</sup>。PGPF は数種の土壌菌類の中から見いだされているがその種類は限られており、また PGPR に比べそれらの報告事例も数例あるにすぎない。これまでに報告されている PGPR や PGPF は、植物の根圏・根面に定着する能力（根圏定着能力；rhizosphere competence）の高いものが多い<sup>2-4,17,23,32)</sup>。根圏定着能力が高いことは PGPR や PGPF が生物防除要員となりうる有望な特性の一つと考えられている。我々の研究室でコウライシバ、コムギ、トウモロコシ、ナスおよびピーマンの根圏と根面から菌類を分離し高い生育促進能力を持つ PGPF を探索したところ、興味深いことにコウライシバから分離された菌類に顕著な生育促進効果を示すものが多く見いだされた<sup>9,10,14-16)</sup>。これらの生育促進効果の例を挙げると茎葉重の対照比でペントグラスに 9.1 倍、ライグラスに 4.4 倍、トマトに 5.1 倍という結果を得ている<sup>9,10)</sup>。また、PGPF の生育促進効果は通常生育初期の幼苗個体に顕著に現れるが、*Phoma* や sterile 菌を用いたコムギの実験では開花期（播種後 10 週目）から種子成熟期（14 週目）に至るまでの長期間にわたって生育促進効果が持続する結果も得られている<sup>14)</sup>。PGPF の根面定着能力は用いた植物の種類と PGPF との組み合わせで異なり、例えば *Phoma* のある菌株はコムギ、オオムギ、ライグラス、キュウリの根に良く定着するのにトマトとダイズには定着割合が低い。

一方、植物の根に菌根といわれる特別な器官を形成する菌根菌も植物の生育を促進し収量を増大することが良く知られている。菌根菌は (i) ectomycorrhiza (外生菌根菌), (ii) vesicular arbuscular mycorrhiza (内生菌根菌), (iii) ectendomycorrhiza (内外性菌根), (iv) arbutoid mycorrhiza (アーブトイド菌根), (v) monotropoid mycorrhiza (モノトロポイド菌根), (vi) ericoid mycorrhiza (エリコイド菌根), (vii)

orchid mycorrhiza (ラン菌根) の7種が知られている。とくに外生菌根と内生菌根は広く遍在して植物と共生している。担子菌類と子のう菌類に含まれる約5,000種の菌類が約2,000種の木本植物に外生菌根を形成する。また、維管束植物のおおよそ5%が単一のまたは複数の菌類と外生菌根を形成している。外生菌根は植物の定着に重要な役割を果たしており、いろいろな国で植栽時に菌根菌を樹木の種苗に処理している。内生菌根菌は農作物と密接な関連をもっており、リンや他のミネラルの吸収を増大し植物の生育やバイオマスを促進している。実際の圃場で内生菌根菌を接種することでコムギやイネなどの穀類ばかりでなくトマトやインゲンあるいはオレンジ、ブドウ、コーヒーなどの収量が増加した例もある。

## II 有用根圏菌類による植物生育促進機構

PGPF や菌根菌などの有用根圏菌類の生育促進機構として、① 有用根圏菌類自体の生育促進物質の産生、② 接種源に用いた大麦粒などの基質あるいは土壌中の有機物を有用根圏菌類が分解し植物に利用しやすくする、いわゆる有機物のミネラルリゼーション化、および ③ 有用根圏菌類による有害微生物の抑制、などが考えられる。

### ① 有用根圏菌類の植物生長ホルモンの産生

ある種の菌類の培養ろ液が植物の根長を促進する例は良く知られている。これはこれらの菌が植物ホルモンを産生するためである。しかしながら、我々が用いた PGPF はいずれの菌の培養ろ液あるいはその希釈液にも根長の促進効果は認められなかった。さらに、PGPF を Murashige and Skoog (MS) 培地に接種したところ、ハクサイの生育は促進されずに、逆に抑制された。これらの結果は、PGPF が植物生長ホルモンを産生しないことを示唆している。

### ② 有用根圏菌類によるミネラルリゼーション

PGPF の含菌大麦粒を MS 培地に加えたところ、いずれの菌も生育促進効果を示さなかった。一方、窒素源を抜いた MS 培地では *Phoma* 菌において生育促進効果が認められたが、他の菌では認められなかった。P 源と K 源を抜いた MS 培地ではいずれの含菌大麦粒を加えても効果はなかった。

PGPF の含菌大麦粒の窒素含量を調べたところ、全窒素量は各菌とも大差なかったが、可溶性窒素のアンモニア態窒素量では差があり、*Phoma* > *Fusarium* > *Penicillium* > *Trichoderma* > 対照の順に多く、特に *Phoma* の含菌大麦粒中には対照の約 7.8 倍含まれていた。PGPF を培養した大麦粒の重量を調べたところ、安定した生育促進効果を示した菌ほど重量が減少する傾向を示した。また、この減少率と PGPF のセルロース分解能およびデンプン分解能の間には高い正の相関が認められた。

これらの結果から、PGPF の生育促進効果は基質に用いた大麦粒や土壌中の有機物を PGPF が植物に取り入れやすい形—例えばアンモニア態窒素—に分解し、その分解物を植物が吸収・利用した結果によるためと思われる。

### ③ 有用根圏菌類による病害抑制

有用根圏菌類による生育促進効果はこれら菌類が土壌中の有害な微生物の働きを阻止することで生じたとも考えられる。前述したようにこれまでに報告されている PGPR や PGPF はいずれも各種土壌病害に対して高い発病抑制効果を示している。我々の研究室で分離した PGPF も高い発病抑制効果があることが予想された。それはキュウリを用いたとき対照とした自然土では *Pythium* による立枯れが激しかったのに PGPF を処理すると立枯れが起こらず生育が良かったことによる。病原菌との組み合わせで異なったもののコウライシバから分離した PGPF は *Pythium aphanidermatum*, *P. irregulare*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, *F. oxy.* f. sp. *cucumerinum*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Cochliobolus sativus* に対して、顕著な発病抑制効果を示した<sup>9,10,23)</sup>。

## III 有用根圏菌類による誘導抵抗

微生物を植物に処理することで植物に抵抗性を誘導する試みは既に 19 世紀初頭から行われてきており、25 種以上の作物で認められている。多くは病原菌が用いられてきた。すなわち、予め少量の病原菌を接種した後に同じ病原菌を多量に接種したときに抵抗性がみられることが多い。この現

象は動物で知られている“免疫”現象と似ていることから、植物の系でも“免疫”という言葉が使われることもある。現在では病原菌以外に非病原菌、弱病原菌、根圏・根面微生物、内生菌、菌根菌など各種の微生物が用いられている。

コウライシバから分離した *Phoma*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium*, *sterile* の各2菌株ずつ（計10菌株）の含菌大麦粒（BGI）、菌糸体および培養ろ液（CF）をキュウリの地下部に接種後、キュウリ炭そ病菌（*Colletotrichum orbiculare*）を本葉第2葉に接種し、出現病斑数と病斑面積を測定し PGPF による植物への全身抵抗性の誘導の有無を調べた。その結果、*Trichoderma* の BGI を除きいずれの菌株の接種源を用いても顕著な病気抑制がみられ、PGPF による抵抗性誘導が認められた<sup>31)</sup>。このようにコウライシバから分離した PGPF では用いた全ての菌株で誘導抵抗がみられたが、PGPR では用いた細菌のわずかに6.4%しか誘導抵抗を示さないことが報告されている<sup>35)</sup>。コウライシバから分離した PGPF と同様にこれまでに各国から報告された PGPF がいずれも誘導抵抗を示すかは不明だが、興味深い。石破らはキュウリ根圏から分離した菌類のキュウリ炭そ病に対する誘導抵抗能を調べたが、誘導抵抗を示す菌類の割合は1.9-2.4%と低かったとしている<sup>50)</sup>。ごく最近、2核 *Rhizoctonia* や *Trichoderma* が植物に誘導抵抗をもたらすとの報告がでてきた<sup>51-53)</sup>。これら2核 *Rhizoctonia* や *Trichoderma* には植物生育促進能を持った菌株もあり、また生物防除要員と見なされているものも多い<sup>17,48,49)</sup>。今後、植物生育促進能を持ったこれらの菌の植物への抵抗性誘導の有無を調べてみる必要があろう。

内生菌根菌を用いた場合でも植物に抵抗性が誘導され各種の地上部病害が抑制されたとの報告があるが、逆に病害を助長した例も多く安定していない。一方、地下部病害に対しては内生菌根菌の感染による全身的な抵抗性誘導により病気の発生が抑制されている例が多い。

コウライシバから分離した PGPF の誘導抵抗の持続期間はキュウリ炭そ病に対し温室で9週間、ほ場で6週間と長期にわたった<sup>33)</sup>。また、これら PGPF は炭そ病以外にキュウリ斑点細菌病（*Pseudomonas syringae* pv.

*lachrimans*) やキュウリつる割れ病(*F. oxy. f. sp. cucumerinum*) にも抵抗性を誘導した<sup>26)</sup>。このように PGPF による誘導抵抗は地上部病害や地下部病害, また, 菌類病から細菌病におよんだが, これは一度抵抗性が誘導された植物は病害の種類(ウイルス病, 細菌病, および菌類病)に関係なく抵抗性を示すというこれまでに知られている誘導抵抗の特性と一致している。

## IV 有用根圏菌類による誘導抵抗の機構

### 1. 有用根圏菌類の根面定着と誘導抵抗

PGPR や PGPF はそれらが植物の根に定着することにより, あるいはそれらの代謝物により抵抗性を誘導する。根への定着性の高い PGPF では BGI の接種形態で処理した場合, PGPF の着生率が高いほど誘導抵抗の割合も高く, 両者の間に正の相関が見られる<sup>32)</sup>。また, これらの BGI をオートクレーブ処理した場合は抵抗性が誘導されない。このことは, これらの PGPF が根に定着する過程で何らかのエリシターが産生されることを示唆している。定着性の PGPF はキュウリの表皮や皮層外部に定着する<sup>23)</sup>。PGPF による根への定着割合は用いたキュウリ品種で異なり, PGPF は炭そ病に抵抗性の品種よりも感受性の品種に高率に定着した<sup>33)</sup>。定着能が低い PGPF を用いても抵抗性は誘導されるが, これらの菌では根への定着率と誘導抵抗の間にはなんら関係がみられない。しかし, 定着能の低い PGPF も高い PGPF と同様にそれらの CF を処理することで抵抗性が誘導されることから, これらの菌が土壌や根の周辺を生育する間に産生されたエリシター物質が植物に抵抗性を誘導したと考えられる。

外生菌根菌や内生菌根菌の場合は, 菌根を形成することで植物体にリンやミネラルなどが吸収され生理的变化が生じ, いわゆる adult resistance が誘起されて抵抗性が増すと考えられている。また, 菌根という形態的变化により病原菌の侵入・感染に対する抵抗性が増大する。

### 2. 抵抗性が誘導された植物体上での病原菌の定着・発芽・感染阻害

PGPF を処理するとキュウリの葉上での *C. orbiculare* 胞子の発芽率が著しく減少するとともに, 付着器からの感染菌糸数も著しく少なくな



る<sup>25,26,54)</sup>。他の研究例でも知られているように抵抗性が誘導された植物ではある種の抗菌物質が産生され、それによって孢子発芽や感染菌糸の産生が阻害されているものと思われる。さらに、PGPF を処理した植物では病原菌が感染しようとする部位にリグニンの集積が認められている<sup>54,55)</sup>。リグニン化に伴い病原菌は感染した細胞外に成長できず病斑進展は抑制される。

内生菌根菌が感染した根では病原菌の植物根への侵入部位の細胞壁が肥厚し、侵入が阻止されたり、植物体内で形成された代謝産物によって病原菌の遊走子のうや厚膜孢子などの形態形成が抑制される。また、ポリフェノールが蓄積し、病原菌の進展を抑制する。

### 3. 有用根圏菌類処理に伴う各種抵抗反応関連酵素の発現

PGPR や PGPF をキュウリの根に処理するとこれまでに抵抗反応に関連する酵素として知られているパーオキシダーゼ (PO), ポリフェノールオキシダーゼ (PPO), キチナーゼ,  $\beta$ -1, 3-グルカナーゼ, フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) などの各種の防衛代謝関連酵素類の発現が認められる場合がある<sup>25,54)</sup>。PGPF 処理により PO は炭そ病菌の挑戦接種後のほぼ3日目から6日目にかけてピークとなりその後は減少した。しかし6日目以降でも無処理に比べると高い値を維持した。PPO は6日目にピークとなりその後は減少した。挑戦接種後の6日目は病斑進展が最大になるときであり、病斑進展が減少するとともに PO や PPO 活性が減少したことを考えると、PO や PPO は抵抗性が誘導された植物での病斑進展の制御に重要な役割を持つことが示唆される。PAL 活性は挑戦接種後の6日まで顕著にみられたが9日目以降は減少し無処理とほぼ同様のレベルとなった。このように PAL においても PO や PPO と同様に活性の増加・減少の時期が病斑進展の増加・減少と良く符合した。また、PAL 活性が防御反応機構の一つと考えられているリグニン化と密接に関連することが示唆された。さらに、加水分解酵素であるキチナーゼや  $\beta$ -1, 3-グルカナーゼは、多くの植物で病原菌の感染後に全身的に集積することが知られているが、PGPF 処理によりこれらキチナーゼと  $\beta$ -1, 3-グルカナーゼの活性が挑戦接種後3日～6日目以降に顕著にみられている<sup>54)</sup>。

菌根菌が感染するときには植物体に前述した各種の防衛代謝関連酵素類の発現が認められないとの報告がある。一方、菌根菌の感染によって植物体に全身的な抵抗性が誘導される場合において、病原菌の侵入時にこれら酵素類の発現が認められるのかどうかは明らかにされていない。

#### 4. 有用根圏菌類の産生するエリシター物質

これまでに PGPR の産生するシデロフォアや抗生物質あるいは細胞壁中のリポポリサッカライドなどがエリシターとして作用することが知られている<sup>30,34,56-58)</sup>が、前述したように PGPF の CF 中にも抵抗性を誘導するエリシター物質が存在する。CF に熱、蛋白除去、脂質除去、透析などの各種処理を行いエリシター物質の特定を試みた結果、耐熱性で蛋白を含まない MW12,000 以上の多糖を中心とした画分に高いエリシター活性が認められた<sup>25,54,55)</sup>。

#### 5. 有用根圏菌類の CF を処理した植物からの活性酸素生成

病原菌の感染や虫害、傷害、低温、乾燥、光などの様々な環境ストレスを受けた植物組織が、急激な活性酸素を生成するという現象（オキシダティブバースト）が知られており、近年植物の生体防御の面から注目されている<sup>59-61)</sup>。オキシダティブバーストは病原体の生長を直接抑制するとともに植物の細胞壁を強める役割も知られているが、とくに防御代謝関連酵素の遺伝子発現やファイトアレキシン生合成を誘導するシグナル中間体として働いている可能性が重要視されている。そこで、PGPF の CF の各分画をタバコのカルスとキュウリ果実に処理しエリシター活性と活性酸素生成およびリグニン化との関係を調べた。はじめに PGPF の *Phoma*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium*, sterile のそれぞれ 2 菌株の CF をタバコカルスに処理した結果、*Trichoderma* の 1 菌株を除きいずれも高い活性酸素生成が認められた<sup>55)</sup>。とくに *Penicillium simplicissimum* の菌株 GP172 では他の菌株の 100 倍以上の活性があった。そこで GP172 の CF の各画分を調整しタバコのカルスとキュウリ果実に処理した結果、MW12,000 以上の多糖を中心とした画分を用いたときにタバコのカルスでは処理後 30 分に、またキュウリ果実からは処理後 15 分に顕著な活性酸素生成が認められた。一方、キュウリ果実からは脂質画分を用いたときに

も処理後 40 分に顕著な活性酸素生成が現れた。このように活性酸素生成は用いた植物種とエリシター物質の違いにより異なることが認められた。さらに、これらの画分を処理したキュウリの胚軸に炭そ病菌を接種したところ、MW12,000 以上の画分と脂質画分で顕著なりグニン集積がみられた。すなわちエリシター活性と活性酸素生成およびりグニン化との間には相互に密接な関係があることが明らかになった。

## おわりに

現代は環境保全の立場から、病害防除に関しても従来の殺菌効果一辺倒に頼った農薬の使用に批判が多い。一方、植物側の抵抗性を増強させて間接的に病害を防除する薬剤が開発されている。プロベナゾール、フェリムゾン、ホセチルが知られているが、前 2 者はいもち病に、また、後者はべと病、疫病などの病害に対し植物に抵抗性を付与する。プロベナゾールとフェリムゾンはこれらがイネ体内に吸収されるといもち病菌の感染により抵抗性が誘導され、その結果、抗菌性物質が生成されいもち病が抑制される。最近では“植物免疫”<sup>62)</sup>の考えを基盤に、植物に全身的な抵抗性を獲得させる“plant activator”と呼ばれる化学物質の開発が盛んである<sup>63)</sup>。“plant activator”とは、それを植物に処理することでサリチル酸やジャスモン酸が合成され、その結果、全身誘導抵抗性遺伝子 (SAR 遺伝子) の発現が促され、リポキシゲナーゼ、パーオキシダーゼ、キチナーゼなどの PR 蛋白質が活性化し、植物の抵抗性を増強させる化学物質である。これまでにある化学物質が“plant activator”とみなされるためには以下の 3 つの基準が必要とされる。それらは、(1) 病原菌に対し直接的な抗菌作用がないこと、(2) “病原菌による誘導抵抗”で得られるのと同じスペクトラムの病気に抵抗性を誘導すること、(3) “病原菌による誘導抵抗”で植物体に認められるのと同じ生化学的変化がこれら化学物質を処理したときにも生じること、である。病原菌を用いたときに生じる全身的誘導抵抗発現においては、サリチル酸がシグナル伝達物質として中心的な役割を担うとする報告が多い<sup>64,65)</sup>。一方、サリチル酸以外にも SAR 遺伝子の発現をもたらす化学物質が知られてきた。これまでにサリチル酸と機能的アナログを

示すイソニコチン酸の誘導体 2, 6-dichloroisonicotinic acid とベンゾチアゾール系化合物 7-acyl-benzo-1, 2, 3-thiadiazole derivatives が “plant activator” としてみいだされており、これらがサリチル酸と同様に植物体に生化学的変化をもたらし各種の感染特異的蛋白質 (PR 蛋白質; pathogenesis-related protein) を集積するとされる。“plant activator” は従来の農薬の概念とは根本的に異なっており、これにより農薬開発は全く新しい時代を迎えるのかも知れない。新たな “plant activator” の探索が今後精力的に行われるであろう。

一方、前述したように微生物、とくに病原菌を植物に処理することで植物に免疫を与える試みは既に 60 年以上も前から行われてきた。また、最近、非病原菌、弱病原菌、根圏・根面微生物、内生菌、菌根菌など各種の微生物を処理することで植物に抵抗性が誘導される事例が報告されはじめているが、微生物により植物体に抵抗性が付与されることは、自然界では当たり前に起こっている現象なのかも知れない。通常、病原菌を用いたときの抵抗性誘導の効果は他の微生物を用いたときよりも高く安定しているが、植物の抵抗性誘導のために病原菌をほ場に導入することは病原菌の拡散をもたらし恐れがあり現実的ではない。また、有用微生物による誘導抵抗では、① 処理部位に壊死反応を伴わない、② 抵抗性が誘導された植物の中にはサリチル酸は集積されず、また、PR 蛋白質も発現しない<sup>66,67)</sup>、および③ サリチル酸の代わりにジャスモン酸が全身抵抗誘導発現のシグナル伝達物質となる<sup>68)</sup>、などの例があるように、誘導抵抗の現象やその機構が“病原菌による誘導抵抗”の場合と異なることがある。植物の病害防御手段は多岐にわたっているのかも知れない。PGPF や菌根菌による誘導抵抗機構を明かにするには今後これらの処理に伴う植物体内での生化学的変化をより詳細に調べる必要がある。ところで、サリチル酸は全身抵抗誘導発現のシグナル伝達物質として中心的な役割を担うとされているが、これを植物に直接処理しても局部的には抵抗性が誘導されるものの全身的な誘導はもたらさない<sup>69)</sup>。一方、活性酸素が全身的抵抗誘導シグナルとして機能していることが近年多く報告されている。本稿で示したように多くの PGPF の CF が顕著な活性酸素生成をもたらしした。また CF 中の活性酸素生成画分

とエリシター活性画分とは一致しており、さらにこれらの画分がリグニンを集積した。各種微生物の CF の活性酸素生成能を調べることで植物に抵抗性を誘導する有望な生物防除要員を探索することが可能になるかも知れない。今後、PGPR や PGPF および菌根菌による誘導抵抗に活性酸素がどのように関わっているのか明らかにする必要がある。

## 参考文献

- 1) Kloepper, J.W., J. Leong, M. Teintze, & M.N. Schroth (1980) *Nature* (London) **286**, 885
- 2) Kloepper, J.W., M.N. Schroth, & T.D. Miller (1980) *Phytopathology* **70**, 1078
- 3) Leong, J. (1986) *Annu. Rev. Phytopathol.* **24**, 187
- 4) Schroth, M.N. & J. Hancock (1981) *Ann. Rev. Microbiol.* **35**, 453
- 5) Chang, Y.-C., Y.-C. Chang, R. Baker, O. Kleifeld & I. Chet (1986) *Plant Disease* **70**, 145
- 6) Dewan, M. & K. Sivasithamparam (1988) *Trans. Br. mycol. Soc.* **91**, 687
- 7) Dewan, M. & K. Sivasithamparam (1989) *Mycological Research* **93**, 156
- 8) Gamiel, A. & J. Katan (1991) *Phytopathology* **81**, 494
- 9) 百町満朗 (1994) 植物生育促進菌類について, 植物防疫 **48**, 252
- 10) Hyakumachi, M. (1994) *Soil Microorganisms* **44**, 53
- 11) Lindsey, D.L. & R. Baker (1967) *Phytopathology* **57**, 1262
- 12) Sneh, B., M. Zeidan, M. Ichielevich-Auster & I. Barash (1986) *Can. J. Bot.* **64**, 2372
- 13) Speakman, J.B. & W. Kruger (1984) *J. Plant Dis. Prot.* **91**, 391
- 14) Shivanna, M.B., M.S. Meera & M. Hyakumachi (1994) *Can. J. Micobiol.* **40**, 637
- 15) Shivanna, M.B., M.S. Meera, K. Kageyama & M. Hyakumachi (1995) *Mycoscience* **36**, 25
- 16) Shivanna, M.B., M.S. Meera, K. Kageyama & M. Hyakumachi (1996) *Mycoscience* **37**, 163
- 17) Baker, R. (1991) "The Rhizosphere and Plant Growth," ed. by D.L. Keister & P.B. Cregan, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 221-228
- 18) Ahl, P., C. Voisard & G. Defago (1986) *J. Phytopathol.* **116**, 121
- 19) Stutz, E.W., G. Defago & H. Kern (1986) *Phytopathology* **76**, 181
- 20) Gardner, J.M., Chandler, J.L. & A.W. Feldman (1984) *Plant Soil* **77**, 103
- 21) Weller, D.M (1984) *Annu. Rev. Phytopathol.* **26**, 379 (1988)

- 22) Ichielevich-Auster, M., B. Sneh, Y. Koltin & I. Barash (1985) *Phytopathology* **75**, 1080
- 23) Shivanna, M.B., M.S. Meera & M. Hyakumachi (1996) *Crop Protection* **15**, 497
- 24) Alstrom, S. (1991) *J. Gen. Appl. Microbiol.* **37**, 495
- 25) Hyakumachi, M. (1997) Proceedings of "The fourth International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria," ed. by A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo & S. Akino, pp. 164-169
- 26) Koike, N., K. Kageyama & M. Hyakumachi (1997) Proceedings of "The Fourth International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria," ed. by A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo & S. Akino, pp. 277-280
- 27) Leeman, M., J.A. van Pelt, F.M. den Ouden, M. Heinsbroek, P.A.H.M. Bakker & B. Schippers (1995) *Phytopathology* **85**, 1021
- 28) Liu, L., J.W. Kloepper & S. Tuzun (1995) *Phytopathology* **85**, 695
- 29) Liu, L., J.W. Kloepper & S. Tuzun (1995) *Phytopathology* **85**: 843
- 30) Maurhofer, M., C. Hase, P. Meuwly, J.-P. Metraux & G. Defago (1994) *Phytopathology* **84**, 139
- 31) Meera, M.S., M.B. Shivanna, K. Kageyama & M. Hyakumachi (1994) *Phytopathology* **84**, 1399
- 32) Meera, M.S., M.B. Shivanna, K. Kageyama & M. Hyakumachi (1995) *Crop Protection* **14**, 123
- 33) Meera, M.S., M.B. Shivanna, K. Kageyama & M. Hyakumachi (1995) *Europe. J. Plant Path.* **101**, 421
- 34) van Peer, R., G.J. Niemann & B. Schippers (1991) *Phytopathology* **81**: 728
- 35) Wei, G., J.W. Kloepper & S. Tuzun (1991) *Phytopathology* **81**: 1508
- 36) Wei, G., J.W. Kloepper & S. Tuzun (1996) *Phytopathology* **86**: 221
- 37) Zhou, T. & T.C. Paulitz (1994) *J. Phytopathol.* **142**, 51
- 38) Zhang, D., W.A. Dick & H.A.J. Hoitink (1996) *Phytopathology* **86**, 1066
- 39) Zhang, D., Y. Han, W.A. Dick, K.R. Davis & H.A.J. Hoitink (1998) *Phytopathology* **88**, 450
- 40) Abbas, Z. & Y. Okon (1993) *Soil Biol. Biochem.* **25**, 1075
- 41) Canaday, C.H. (1991) *Plant Disease* **75**, 969
- 42) Singh, P.J. & R.S. Mehrotra (1980) *Plant Soil* **56**, 475
- 43) Chanway, C.P. & L.M. Nelson (1991) "The Rhizosphere and Plant Growth," ed. by D.L. Keister & P.B. Cregan, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 365
- 44) Howie, W.J. & E. Echandi (1983) *Soil Biol. Biochem.* **15**, 127
- 45) Yuen, G.Y. & M.N. Schroth (1986) *Phytopathology* **76**, 176

- 46) Becker, J.O. & R.J. Cook (1988) *Phytopathology* **78**, 778
- 47) Narita, Y. & T. Suzui (1991) *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* **57**, 301
- 48) Harris, A.R., D.A. Schisler & M.H. Ryder (1993) *Soil Biol. Biochem.* **25**, 909
- 49) Siwek, K., A.R. Harris & E.S. Scott (1997) *J. Phytopathology* **145**, 417
- 50) 石破知加子・谷 利一・宇田川俊一・一戸正勝・村田雅彦 (1979) 日菌報. **20**, 220
- 51) Sneh, B.: 私信
- 52) Xue, L., P.M. Charest & S.H. Jabaji-Hare (1998) *Phytopathology* **88**: 359
- 53) Elad, Y.: 私信
- 54) Shivanna, M.B., M.S. Meera & M. Hyakumachi. (1996) "Advance in Biological Control of Plant Diseases", ed. by T. Wenhua, J. Cook & A. Rovira, China Agricultural University Press, Beijing, China, pp 175-184
- 55) Koike, N., K. Kageyama, M. Hyakumachi, S. Tsuyumu, H.-J. Park & N. Doke (1997) Proceedings of "The Fourth International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria," ed. by A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo & S. Akino, pp. 269-272
- 56) Defago, G. & D. Haas (1990) *Soil Biochemistry Vol. 6.* Marcel Dekker, Inc., New York, 249-291
- 57) Laville, J., C. Voisard, C. Keel, M. Maurhofer, G. Defago & D. Haas (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **89**, 1562
- 58) Leeman, M., J.A. van Pelt, F.M. Den Ouden, M. Heinsbroek, P.A.H.M. Bakker & B. Schippers (1995) *Phytopathology* **85**, 1021
- 59) Doke, N. (1983) *Physiol. Plant Path.* **23**, 345
- 60) Kondo, Y., F. Hanawa, T. Miyazawa & J. 志雄 Mizutani (1993) "Mechanisms of Plant Defence Responses," ed. by B. Fritig & M. Legland, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 148-151
- 61) Wojtaszek, P. (1997) *Chemical Journal* **322**, 681
- 62) Kuc, J. (1982) *Bioscience* **32**, 854
- 63) Kessmann, H., T. Staub, C. Hoffmann, T. Maetzke, J. Herzog, E. Ward, S. Uknes & J. Ryals (1994) *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**: 439
- 64) Delanay, T.P., S. Uknes, B. Vernooij, L. Friedrich, K. Weymann, D. Negrotto, T. Gaffney, M. Gut-Rella, H. Kessmann, E. Ward & J. Ryals (1994) *Science* **266**, 1247
- 65) De Meyer, G. & M. Hofte (1997) *Phytopathology* **87**, 588
- 66) Hoffland, E., C.M.J. Pieterse, L. Bik & J.A. van Pelt (1995) *Physiol. Mol. Plant Path.* **46**, 309
- 67) Pieterse, C.M., S.C.M. van Wees, E. Hoffland, J.A. van Pelt & L.C. van Loon (1996) *Plant Cell* **8**, 1225

- 68) van Loon, L.C., P.A.H.M. Bakker & C.M.J. Pieterse (1997) Proceedings of "The Fourth International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria," ed. by A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo & S. Akino, pp. 50-57



## IGE シリーズ

\*印……特定のテーマ又はトピックについての説明に関するもの。

\*\*印……特定のテーマ又はトピックに関する最新の文献, 実験法の紹介に重点をおくもの。

\*\*\*印……新しい可能性を求める学際的交流, 対話を試みるものの。

- No. 1\*      植物の系統発生と重力反応
- No. 2\*      微生物と光
- No. 3\*\*\*    水田湛水生態系の新研究 (1)  
—— 遺伝情報, エントロピー則から見る ——
- No. 4\*\*    トランスジェニック植物およびオルガネラの遺伝子発現
- No. 5\*      エチレンの生態的役割
- No. 6\*      植物の光反応機構の解析と変異株
- No. 7\*\*\*    土壌微生物アセスメントの背景 (1)  
—— 検出・定量の諸問題 ——
- No. 8\*\*    イネの遺伝子発現と系統分化
- No. 9\*\*\*    生態研究と環境制御
- No. 10\*\*    植物・微生物の光反応  
—— 変異株などを用いた新しい解析法の開発 ——
- No. 11\*\*\*   水田湛水生態系の新研究 (2)  
—— 化学生態学と元素の周期律 ——
- No. 12\*    植物病原体の分子生態学

- No. 13\*      土壤環境  
—— 保全と機能の増進 ——
- No. 14\*\*\*    微生物生態と分子生物の接点  
—— 環境適応を中心に ——
- No. 15\*      環境変動と植物・微生物の生活  
—— 紫外線を中心として ——
- No. 16\*      真核微生物の環境応答と遺伝子発現
- No. 17\*      植物の形質発現と環境適応機構
- No. 18\*\*     植物の系統分化及び遺伝変異の誘導と解析
- No. 19\*\*     窒素固定の遺伝生態
- No. 20\*\*\*    遺伝生態の諸問題
- No. 21\*\*\*    臨界環境における植物の生活
- No. 22\*      Plants in Space Biology
- No. 23\*\*\*    遺伝生態情報の可能性
- No. 24\*\*\*    遺伝生態研究の台頭, 発展, そして未来への展望
- No. 25\*      生物の生殖と遺伝的多様性
- No. 26\*\*\*    微生物の共生戦略の分子機構と多様性

IGE シリーズ 26

微生物の共生戦略の分子機構と多様性

---

発行 1999 年 3 月  
発行者 東北大学遺伝生態研究センター  
〒 980-8577 仙台市青葉区片平 2-1-1  
☎ 022-217-5706 (共同利用掛)  
印刷所 笹氣出版印刷株式会社